

Departement Pferde der Vetsuisse-Fakultät Universität Zürich

Direktor: Prof. Dr. med. vet. Jörg A. Auer

Arbeit unter der Leitung von Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg

Musculoskeletal Research Unit (MSRU)

Evaluation von zwei verschiedenen Osteotomiemethoden in einer experimentellen Studie an Schafen

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Vetsuisse-Fakultät

Universität Zürich

vorgelegt von

Michaela Carina Pongratz

Tierärztin

aus Mollis (GL)

Genehmigt auf Antrag von

Prof. Dr. med. vet. Brigitte von Rechenberg, Referentin

Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Dr. med. habil. Robert Sader, Korreferent

Zürich 2008

Für meine Familie und Freunde,
die immer an mich geglaubt haben

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungs-/Erklärungsverzeichnis	1
Zusammenfassung	3
Summary	5
1. Einleitung	6
2. Literatur	7
2.1. Regeneration des Knochengewebes	7
2.2. Polychrome Sequenzmarkierungen	8
2.3. Verfahren der Knochendurchtrennung	8
2.4. Laser-Systeme	10
2.4.1. Der Erbium:YAG-Laser	11
2.5. Piezoelektrisches System	12
3. Tiere, Material und Methoden	13
3.1. Aufbau der Studie	13
3.2. Daten Osteotomie-Systeme	14
3.3. Versuchstiere	14
3.4. Vorbereitung der Versuchstiere	14
3.5. Operation	15
3.6. Postoperativer Verlauf	18
3.7. Probenverarbeitung	18
3.7.1. Gewinnung und Aufbereitung der Proben	18
3.7.2. Untersuchungsmethoden	21
3.7.2.1. Makroskopische Auswertung	21
3.7.2.2. Radiologische Auswertung	21
3.7.2.3. Histomorphometrische Auswertung der Dickschnitte	23
3.7.2.4. Statistik der makroskopischen und radiologischen Auswertung und der Dickschnitte	23
3.7.2.5. Qualitative Auswertung der Fluoreszenzschnitte	23
3.7.2.6. Qualitative Auswertung der Dünnschnitte	24
4. Resultate	25
4.1. Operation	25
4.2. Verlauf	25
4.3. Makroskopische Befunde	26
4.4. Radiologische Befunde	27
4.5. Histomorphometrische Resultate	29
4.6. Qualitative Resultate	30
5. Abbildungen	33
6. Diskussion	35
6.1. Versuchsmodell	35
6.2. Operation und Verlauf	35
6.3. Probenaufbereitung und -auswertung	36
6.4. Radiologische Auswertung	37
6.5. Histologische Auswertung	37
6.6. Statistik	38
6.7. Schlussbeurteilung	39
6.8. Ausblick	39
7. Literaturverzeichnis	41
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	46
8. Danksagung	47
9. Curriculum Vitae	48

ABKÜRZUNGS-/ERKLÄRUNGSVERZEICHNIS

bone marrow	Knochenmark
bzw.	beziehungsweise
Callus	Gewebeneubildung
Cis-Cortex	plattennah
d.h.	daher, das heisst
Fx	Fraktur
Gap	Spalt
gap healing	Spaltheilung
i.m.	intramuskulär
intra-OP	intraoperationem, während der Operation
I.U.	International Units = internationale Einheiten
i.v.	intravenös
LC-DCP	Low-Contact Dynamic Compression Plate
PMMA	Poly-Methylmetacrylat
prä-OP	präoperationem, vor der Operation
p.o.	per os
post-mortem	nach dem Tod
post-OP	postoperationem, nach der Operation
Remodelling	Umbau, Gestaltung
s.c.	subcutan
Trans-Cortex	plattenfern
z.T.	zum Teil

ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der Studie: In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss zweier verschiedener Osteotomiemethoden (Er:YAG-Laser und Piezosurgery Gerät) auf die Knochenheilung untersucht, um diese mit einem konventionellen Sägeblatt [78] zu vergleichen.

Tiere, Material & Methoden: Bei vierundzwanzig Schafen wurde eine Osteotomie am Tibiaschaft vorgenommen, wozu bei jeweils zwölf Tieren der Er:YAG-Laser respektive das Piezosurgery Gerät verwendet wurde.

Die Osteotomiestelle wurde mit einer 3.5 mm dicken, low-contact dynamic compression plate (LC-DCP) refixiert. Im 4-Wochen Intervall wurden Kontrollröntgenbilder der Tibiae angefertigt und den Schafen der jeweilige Fluoreszenzmarker injiziert.

Resultate: Alle Operationen konnten wie geplant durchgeführt werden und die postoperative Phase verlief komplikationslos. Die Schafe wurden nach 8 bzw. 12 Wochen geschlachtet und die entnommenen Knochenproben einer makroskopischen, radiologischen, histologischen (semiquantitative und qualitative Scoring-Systeme) und einer quantitativen Auswertungstechnik, der Histomorphometrie, unterzogen.

Sowohl die mit dem Er:YAG-Laser osteotomierte 12-Wochen Gruppe, als auch die 12-Wochen Gruppe, welche mit dem Piezosurgery Gerät operiert worden war, zeigten Osteotomiestellen, die makroskopisch und radiologisch kaum mehr sichtbar waren und nur noch wenig periostalen Callus. Gap healing and Remodelling waren somit weit fortgeschritten und präsentierten eine exzellente Knochenheilung. Die Rekonstruktion der Knochenmarkshöhlen war beinahe vollständig abgeschlossen. Statistische Unterschiede wurde zwischen den beiden Gruppen nicht gefunden.

Diskussion & Schlussfolgerung: Die Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass sich beide Methoden gut für Osteotomien am lebenden Knochen eignen. Besonders der Gebrauch des Er:YAG-Laser zeigte deutliche Vorteile. Neben dem unblutigen und kleinen Operationsfeld bietet er dank dem kontaktlosen Schneiden völlig neue Schnittgeometrien an, ebenfalls entstehen kaum Abfälle von Knochenstaub oder Metallspänen. Der Hauptvorteil jedoch liegt in der präzisen und effizienten Anwendung ohne Heilungsverzögerung und ohne sichtbare thermische Defekte.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass diese Technik mit Sicherheit Potential für künftige wiederherstellende Gesichts- und Kieferchirurgien in sich birgt.

SUMMARY

Goal of the study: The aim of this study was to investigate the effects of two different osteotomy methods (Er:YAG-Laser and a Piezosurgery sonography) on bone healing and to compare these methods to those using conventional or customised sawblades [78].

Animals, material & methods: A midshaft tibial osteotomy was performed on twenty-four sheep - using the Er:YAG-Laser (twelve sheep) or Piezosurgery (twelve sheep).

Following osteotomy, fixation was achieved using a 3.5 mm wide low-contact dynamic compression plate (LC-DCP). Thereafter the sheep were injected with fluorochromes and control radiographs were taken at 4 weeks intervals.

Results: No peri- or postoperative complications were recorded. The sheep were sacrificed after 8 and 12 weeks and bone samples were examined macroscopically, radiographically and histologically. Semiquantitative and qualitative scoring systems as well as histomorphometry was used to evaluate histological sections.

In the 12-week group, where osteotomy was performed using the Er:YAG-Laser as well as following the piezosurgery, the osteotomy gaps were almost invisible macroscopically and radiographically and minor periosteal callus was present. Gap healing and advanced bone remodelling were evident at the edges of the original osteotomy representing evidence of excellent bone healing. Differences between groups were minimal and statistically not significant.

Discussion & conclusion: Our data support that both methods the laser and piezoelectric scalpel are suitable methods for osteotomy. Use of a laser to perform osteotomies on vital bone offers many potential advantages, including provision of less contact, blood and vibration within the surgical field, provision of a smaller field, free choice of cut-off geometry and prevention of generation of bone dust combined with metal abrasion. But the key advantage of an Er:YAG-Laser osteotomy is the fast, effective bone ablation without any delays on bone healing and no visual thermal effects.

In conclusion, laser systems offer a technique for osteotomy which is equally as precise and efficient as saw techniques are and offer great promise for orthopaedic, oral and maxillofacial surgeries.

1. EINLEITUNG

"Laser osteotomy is feasible, but improvements will be needed to make such bone cutting as efficient and controllable as the rotating bur." Diese Aussage stammt aus einer Veröffentlichung aus dem Jahre 1979, welche im Journal of Oral Surgery publiziert wurde [70]. Die Wissenschaft hat in der Zwischenzeit Meilensteine gesetzt und diese Arbeit soll vor Augen führen, dass dieses Ziel mittlerweile erreicht wurde. Wir sind heute in der Lage, mittels Laser-Systemen komplexe Osteotomien mindestens so kontrolliert und effizient durchzuführen wie mit konventionellen Rotationsknochensägen.

Die Grundlage für diese Studie war die Suche nach verbesserten Methoden für die Gesichts- und Kieferchirurgie [40], da gerade im Bereich der Wiederherstellungschirurgie bei der plastischen Konstruktion der dünnen Gesichtsknochen Grenzen gesetzt sind [13]. Mit dieser Arbeit wurden in einem ersten Schritt die Handlichkeit, Exaktheit und Kontrollierbarkeit der neuen Methoden bei einer geraden Osteotomie durch einen Röhrenknochen sowie die darauf folgende Knochenheilung getestet. Weitere Schritte, wie gekurvte Osteotomien und die Anwendung an dünnen Knochen, sind Ziele für zukünftige Arbeiten.

Die Erwartungen in diesem Projekt sowohl an den Er:YAG-Laser als auch an das Piezosurgery Gerät sind wie folgt zu formulieren. Bei beiden Techniken wird eine minimale Traumatisierung des Knochens während der Osteotomie und danach ein komplikationsloser, zügiger Durchbau dieser Region gewünscht. Durch den Vorteil des kontaktlosen Schneidens und der daraus resultierenden Möglichkeit von gekurvten Osteotomien scheint insbesondere der handliche Er:YAG-Laser zukunftsweisend zu sein. Neben dem kleinen Operationsfeld, der hohen Präzision, der effizienten und raschen Knochendurchtrennung mit minimalem thermischen Tiefeneffekt und der fehlenden Verzögerung im Heilungsprozess hat ein Laser auch den Vorteil [37; 81], dass weder Knochenstaub noch Metallspäne produziert werden und die Frakturstelle somit frei von für die Heilung irritierendem Material bleibt.

Verschiedene Laser-Systeme werden schon länger erfolgreich bei Arthroskopien, Weichteiloperationen, Hämostasierungen und für Tumorthérapien eingesetzt [67; 68] ebenso wie Piezoelektrische Systeme in der Weichteilchirurgie [19; 20; 41] hingegen wurden diese Techniken bisher noch kaum bei vitalem, gewichtstragendem Knochengewebe verwendet [7]. Die vorliegende Arbeit zeigt auf, dass die erhofften Ziele in einem ersten Schritt erreicht wurden und mit Folgestudien, d.h. mit einer gekurvten Schnittgeometrie und Osteotomien an flachen Knochen, begonnen werden kann.

2. LITERATUR

2.1. Regeneration des Knochengewebes

Wie schon vor Jahrzehnten erkannt und entsprechend definiert, liegt die Besonderheit der Frakturheilung darin, dass es sich nicht um eine Reparation, sondern um eine knöcherne Regeneration handelt [6; 15], weshalb nach Abschluss der Heilung meist nicht einmal mehr Anzeichen der ursprünglichen Fraktur erkennbar sind.

Der Ablauf einer Frakturheilung kann unter verschiedenen Gesichtspunkten betrachtet werden; klassischerweise werden die gestuft ablaufenden Vorgänge in vier histologisch-morphometrische Stadien unterteilt [4; 5; 30; 55; 60]: Entzündungsphase, weicher und harter Callus und Remodelling [33].

Bei einem frakturierten Knochen können die erwähnten Phasen unterbrochen oder durch andere Mechanismen weitergeführt werden, je nach entsprechender Frakturbehandlung [15; 39]. Hierbei spielt vor allem die Art und Weise der Fraktur-Stabilisierung eine Rolle [15; 17; 39; 56] welche in rigide und semi-rigide Formen eingeteilt wird. Bei der semi- bzw. nicht-rigiden Form sind noch mikromechanisch kleinste Bewegungen möglich weshalb es sich nicht um eine absolute Ruhigstellung handelt.

Rigide Stabilisierungen werden zum Beispiel durch die Verwendung von DCP-Platten erreicht, welche unter Kompression eine Fixierung ohne mikromechanische Beweglichkeit erzielen und eine sogenannte direkte oder primäre Knochenbruchheilung ohne radiologisch sichtbaren Callus ermöglicht [56; 58; 64; 66; 85]. Bis heute ist unklar, welcher Faktor das Remodelling dieser starr fixierten Frakturen indiziert - eine lokale Nekrose wäre ein möglicher Stimulus [56].

Für eine semi-rigide Form der Fraktur-Stabilisierung werden intramedulläre Nägel, Plattensysteme mit Fixateur-interner Funktion und Schienen- oder Fixations-/Gipsverbänden verwendet. Diese Art der Heilung ist funktionell günstiger, da ein gewisses Mass an Fixation die Fragmente ausrichtet, diese aber nicht komprimiert [83]. Die semi-rigiden Formen durchlaufen alle vier Heilungs-Phasen; es entsteht ein radiologisch sichtbarer Callus, weshalb dieser Verlauf als indirekte/sekundäre oder spontane Knochenbruchheilung bezeichnet wird [15; 56]. Unter Callus verstehen wir eine Gewebeneubildung, welche die ossäre Vereinigung zweier Knochenfragmente einleitet. Der Callus ist somit die Gesamtheit des bindegewebigen, knorpeligen und knöchernen Verbindungsgewebes, wobei sich die einzelnen Gewebetypen räumlich und zeitlich im Neben- und Nacheinander zeigen [43].

2.2. Polychrome Sequenzmarkierungen

Um die aufeinanderfolgenden histologisch-morphometrischen Phasen zu veranschaulichen, wurde in dieser Studie mit mehrfarbigen Fluoreszenzmarkierungen gearbeitet. Durch die Anwendung dieser polychromen Sequenzmarkierung liessen sich die stufenweise ablaufenden Vorgänge der Appatitablagerung bzw. Knochenneubildung zeitlich gezielter bestimmen. Das heisst, dass während der Mineralisationsphase die Fluorochrome eine Komplexbindung mit dem neu gebildeten Knochenmineral eingehen und das Fortschreiten der Knochenbildung zu einem Tieferwandern der markierten Schicht führt. Durch die Markierung in frei wählbaren Zeitintervallen mit farblich kontrastierenden Fluorochromen, wird eine intravitale Zeitmarke in verschiedenen Knochenschichten, ähnlich der Jahrringbildungen in Holz, erreicht. Mit der Fluoreszenztechnik werden somit Informationen zur Dynamik des kalkhaltigen Gewebes erhoben [57]. Über Jahre wurde mit verschiedenen Reihenfolgen von Farbmarkern experimentiert um eine optimale Kombination zu ermitteln [16; 42; 52; 59; 74].

Basierend auf diese Erkenntnisse wurden für diese Studie die Substanzen Calceingrün (Emission im Knochen bei 540 nm), Xylenolorange (Emission im Knochen bei 615 nm) und das gelbfluoreszierende Tetracyclin (Emission im Knochen bei 525 nm) verwendet. Es handelt sich bei diesen Substanzen um synthetisch hergestellte Farbstoffe aus Porphyrinen, und beim Tetracyclin um ein Antibiotikum mit der bekannte Nebenwirkung der Komplexbildung mit frisch verkalkendem Knochenmineral.

2.3. Verfahren der Knochendurchtrennung

Die intraoperative Knochendurchtrennung stellt einen integrierten Bestandteil des übergeordneten operativen Gesamtkonzeptes dar, welches unter Einbezug der verfügbaren Geräte und Techniken erstellt wird. In ein chirurgisch-orthopädisches Verfahrenskonzept fliessen Informationen zur anatomischen Lokalisation mit ihrer spezifischen Vaskularisation und dem Zugangsweg durch die Weichteile, zu den biologischen und mechanischen Ansprüchen an die Schnittfläche sowie zu den verwendeten Implantaten ein. Je höher die biologischen Anforderungen an die Schnittflächen sind, desto entscheidender sind Gewebeschonungen und Vermeidung von Hitzeentwicklungen [1].

Diesbezüglich hohe Ansprüche hat zum Beispiel die wiederherstellende und plastisch konstruierende Mund-Kiefer-Gesichtsorthopädie [13]. Bei solchen Chirurgien wird versucht, das umgebende Weichteilgewebe, das Periost und die Medullarsysteme maximal zu schonen. Gerade in diesem anspruchsvollen Spezialgebiet zeigt sich die unterschiedliche Eignung der

verschiedenen Verfahren zur Knochendurchtrennung. Im Folgenden werden jene Verfahren ausführlicher beschrieben, welche eine Bedeutung für die vorliegende Arbeit bzw. deren Zielsetzung haben.

Der Meissel kommt im Gebiet der Orthopädie heute noch zum Einsatz, da es sich um ein einfaches Werkzeug handelt, welches keine apparative Energieversorgung benötigt und den Knochen keiner denaturierenden Hitzeeinwirkung aussetzt. Ebenfalls vorteilhaft ist, dass ein schmaler Meissel bereits durch eine kleine Hautinzisionen wenig invasiv und gewebeschonend eingeführt werden kann. Nachteile sind, dass Knochensplinter oder Fissuren bei sprödem Knochenmaterial entstehen können und der Meissel nicht absolut exakt geführt werden kann [1].

Die oszillierende Säge stellt trotz einiger Nachteile das Standardwerkzeug in der Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie dar, weil zurzeit noch kein vergleichbares bzw. besseres Instrument zur Verfügung steht. Sie ist nicht so handlich wie ein Meissel, benötigt eine Stromversorgung und führt aufgrund der denaturierten Schnittflächen durch Wärmeentwicklung aufgrund von Weichteiltraumatisierungen zu einer verzögerten Knochenkonsolidierung. Letzteres führt zudem zu einem Verlust der Selbsttamponierung und damit zu einer schlechten Entlastung des Frakturhämatoms und zu einer grösseren Narbe. Die exakte mechanische Führung spricht für die Verwendung einer oszillierenden Säge. Um die Nachteile zu reduzieren, wird fortwährend an Verbesserungen gearbeitet, aber gewisse Effekte werden sich nie absolut vermeiden lassen [1].

Die Ultraschallsäge, das so genannte Piezosurgery Gerät oder Piezoelektrische System, wird als Standardwerkzeug im zahnmedizinischen Bereich, d.h. vor allem bei nicht-vitalem Knochengewebe, eingesetzt. Diese Studie hat gezeigt, dass sich diese Technik ebenfalls sehr gut eignet, um vitales, gewichttragendes Knochengewebe zu durchtrennen. Neben dem exzellenten Handling und der raschen Schneidezeit, zeichnet es sich dadurch aus, dass die durchtrennte Knochenstelle sehr schmal und die Schnittoberfläche sehr fein ist, was eine schnelle und unkomplizierte Knochenheilung zur Folge hat. Dies wurde auch schon in neuesten Studien gezeigt [73]. Ein weiterer Vorteil ist, dass sich der Schneidekopf sofort abschaltet, wenn kein Kontakt mehr mit mineralisiertem Gewebe besteht [36; 69; 77]. Somit kann dieses Instrument in sehr risikoreichen Regionen angewendet werden, zum Beispiel am Schädeldach, wo die Dura mater nicht perforiert werden soll [18; 76].

Laser-Systeme sind die zukunftsweisenden Techniken in diesem chirurgisch-orthopädischen Bereich. Sie werden ebenfalls in der Zahnmedizin eingesetzt [47; 82], wie auch das beschriebene Piezosurgery Gerät, jedoch noch nicht als Standardoperationswerkzeug bei vitalem Knochengewebe.

Da Laser-Systeme, im Gegensatz zu allen anderen beschriebenen Techniken, die Schnittstelle nicht berühren müssen, d.h. ohne direkten Kontakt Knochen durchtrennen können, werden völlig neue Schnittgeometrien möglich. Zu Beginn des letzten Jahrhunderts wurde versucht, mit einem Bohrer Knochen zu durchtrennen [1], nachdem zuvor gekurvte Trennungslinien mit dem Meissel vorgezeichnet worden waren - diese Art der gekurvten Schnittführung ist der Laser-Osteotomie jedoch aus bereits erwähnten Gründen deutlich unterlegen.

Neben dem kleinen Operationsfeld, der hohen Präzision und der effizienten und raschen Knochendurchtrennung können Osteotomien mit Laser-Systemen auch ohne visuell sichtbare schädigende Wärmeentwicklung vorgenommen werden. Ein weiterer Vorteil des Lasers ist, dass weder Knochenstaub noch Metallspäne in der Operationswunde zurückbleiben welche zu einer Heilungsverzögerung aufgrund entzündlicher Prozesse wegen des Fremdmaterials führen könnten.

Es scheint, als wäre mit dem Laser das ideale Osteotom gefunden worden, da dieser die Anforderungen in allen Punkten erfüllt [28]. Innerhalb der Laser-Systeme bestehen Unterschiede bezüglich der Erfüllung dieser Anforderungen, welche sich aus der unterschiedlichen Wellenlänge und Pulsstruktur des Laserstrahls ergeben. Der von uns getestete Er:YAG-Laser kommt den gestellten Ansprüchen äusserst nahe.

2.4. Laser-Systeme

Das Wort Laser ist eine Abkürzung von Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation. Das Kernstück eines jeden Lasers ist der Laserkopf, bestehend aus dem Lasermedium, zwei reflektierenden Spiegeln und einem System für den Energieanschluss. Es können viele verschiedene Substanzen als Lasermedium verwendet werden und normalerweise wird das Laser-System nach der verwendeten Substanz benannt. Das Lasermedium wird bei Gebrauch mit Energie versorgt, worauf eine Emission von Photonen ausgelöst oder elektromagnetische Wellen stimuliert werden. Die zwei Spiegel werden entsprechend bestrahlt und ein Strahl einer bestimmten Wellenlänge wird ausgesendet. Einer der beiden Spiegel ist teilweise permeabel und lässt so den Laserstrahl passieren. Der

Laserstrahl ist folglich ein energetisch monochromatischer Strahl von genau definierter Wellenlänge [3].

Der Effekt des Laserstrahls hängt massgeblich von zwei Faktoren ab, einerseits von der Wellenlänge und andererseits von der Pulsrate [71], weiter aber auch vom Absorptionskoeffizienten des Gewebes [3]. Wenn diese Hauptfaktoren ideal übereinstimmen, wird die Laserenergie maximal vom Gewebe absorbiert und der gewünschte chirurgische Effekt, wie zum Beispiel ein Schnitt, wird erzielt. Das Zentrum des Strahls, welcher auf das Gewebe auftrifft, enthält soviel Energie, dass das Gewebe unverzüglich vaporisiert wird und keine Geweberückstände in der Schnittwunde zurückbleiben. Die Temperaturen sind jedoch nicht so hoch, dass das Gewebe sichtbar geschädigt und karbonisiert werden könnte [53; 54] bzw. die Geräte sind inzwischen so hochentwickelt, dass dies nicht mehr geschieht [63].

In bestehenden Arbeiten wurden die Basismechanismus der Knochendurchtrennung mit Laser-Systemen [45; 51; 79; 80], die resultierende Knochenheilung [26; 38; 46; 72] und die Vor- und Nachteile der verschiedenen Laser-Systeme [7; 11; 12; 18; 25; 32; 50] diskutiert. In dieser Studie entschied man sich für einen Er:YAG-Laser, über welchen in der Literatur bisher wenige Informationen zu finden sind, welche aber durchwegs positiv ausfallen [37; 63].

2.4.1. Der Erbium:YAG-Laser

Wie schon im vorherigen Abschnitt erwähnt, werden Laser-Systeme meist nach der Substanz ihres Mediums benannt, was auch beim Er:YAG-Laser zutrifft. Folgende Substanzen geben ihm den Namen: Erbium, Yttrium, Aluminium und Granat. Der für diese Studie verwendete Er:YAG-Laser emittiert einen Strahl der Wellenlänge von 2940 nm und ist fähig, eine Pulsrate von 50-300 μ s zu produzieren bei einer konstanten Repetition von 10-20 Hz. Die Osteotomien wurden mit einer Energie von 50-200 mJ per Puls durchgeführt. Das Laserlicht wurde direkt in den Gelenkarm mit Kopfstück geleitet. Der Strahl wurde mittels Spiegeln durch diesen Arm gelenkt und mittels Linsen zu einem Strahl gebündelt, welcher an der Spitze des Kopfstückes austrat. Der Spot size betrug bei diesem Er:YAG-Laser 900 μ m. Das Kopfstück ist sterilisierbar (ETO oder Autoklav) und hat eine fakultativ zu bedienende Sprühdüse inkorporiert. Die adäquate Wasserzuführung ist sehr wichtig, um Karbonisierungen des Knochens zu umgehen und wird deshalb empfohlen [34; 37; 61]. Die Arbeitsdistanz für die zu durchtrennenden Knochen beträgt etwa 7 mm. Der verwendete Laser arbeitet in einem nicht sichtbaren Infrarotbereich im elektromagnetischen Spektrum und einem Leitstrahl, der im sichtbaren Bereich liegt.

2.5. Piezoelektrisches System

Das Piezoelektrische System, das Piezosurgery Gerät, ist eine Osteotomietechnik, welche mittels ultrasonographischer Schwingungen ein mikrofibrierendes Schnittstück in Schwingung versetzt. Das physikalische Prinzip des sogenannten reziproken oder indirekten Piezoeffektes basiert darauf, dass eine Deformation von Piezokristalle in einem elektrischen Feld geschieht. Eine strominduzierte Polarisierung der Kristalle bewirkt eine Expansion des Materials in Richtung der Polarität, was Mikroviibration im Schnittstück auslöst [31; 73]. Durch diese Methode wird das Weichteilgewebe selbst bei unbeabsichtigtem Kontakt nicht verletzt. Dies deshalb, weil sich der Schneidekopf sofort abschaltet wenn der Kontakt zum mineralisierten Gewebe unterbrochen wird [36; 69; 77]. Die Mikroviibrationen haben eine Frequenz von 24-29 kHz mit einer Amplitude von 60-200 μm pro Sekunde. Das Schnittstück ist mit einer Nitrotitanveredelung oberflächenverhärtert und auswechselbar. Gekühlt wird die Osteotomiestelle mit physiologischer Kochsalzlösung bei einer Temperatur von etwa 4 °C [36; 73]. Das Piezoelektrische System ist ebenfalls sehr handlich [76], somit kann mit leichter Hand gearbeitet werden [44], was wiederum eine kontrollierte Führbarkeit und präzises Schneiden ermöglicht [29; 40; 76].

3. TIERE, MATERIAL UND METHODEN

3.1. Aufbau der Studie

Für die experimentelle Studie wurden insgesamt 24 Schafe der Rasse weisses Alpenschaf verwendet. Diese wurden in 4 Gruppen zu je 6 Tieren eingeteilt. Bei den ersten 12 Tieren wurde der Er:YAG-Laser zur Osteotomie verwendet, bei den anderen 12 Tieren das Piezosurgery Gerät. Je 6 Tiere der jeweiligen Osteotomievariante wurden nach 8 bzw. 12 Wochen postoperationem geschlachtet (Tabelle 1). Jeweils die Hälfte der Tiere wurde an der linken Tibia, die andere Hälfte an der rechten Tibia operiert.

Tabelle 1: Übersicht über Schafe, Osteotomievarianten und Zeitfenster

Schafnummer	Operiertes Bein	Osteotomievariante	Zeitfenster
1941	Tibia links	Er:YAG-Laser	12 Wochen
1942	Tibia links	Er:YAG-Laser	12 Wochen
1943	Tibia links	Er:YAG-Laser	12 Wochen
1944	Tibia rechts	Er:YAG-Laser	12 Wochen
1945	Tibia rechts	Er:YAG-Laser	12 Wochen
1946	Tibia rechts	Er:YAG-Laser	12 Wochen
1947	Tibia rechts	Er:YAG-Laser	8 Wochen
1948	Tibia rechts	Er:YAG-Laser	8 Wochen
1949	Tibia rechts	Er:YAG-Laser	8 Wochen
1950	Tibia links	Er:YAG-Laser	8 Wochen
1951	Tibia links	Er:YAG-Laser	8 Wochen
1952	Tibia links	Er:YAG-Laser	8 Wochen
1953	Tibia links	Piezosurgery Gerät	12 Wochen
1954	Tibia links	Piezosurgery Gerät	12 Wochen
1955	Tibia links	Piezosurgery Gerät	12 Wochen
1956	Tibia rechts	Piezosurgery Gerät	12 Wochen
1957	Tibia rechts	Piezosurgery Gerät	12 Wochen
1958	Tibia rechts	Piezosurgery Gerät	12 Wochen
1961	Tibia links	Piezosurgery Gerät	8 Wochen
1962	Tibia links	Piezosurgery Gerät	8 Wochen
1963	Tibia links	Piezosurgery Gerät	8 Wochen
1964	Tibia rechts	Piezosurgery Gerät	8 Wochen
1965	Tibia rechts	Piezosurgery Gerät	8 Wochen
1966	Tibia rechts	Piezosurgery Gerät	8 Wochen

3.2. Daten Osteotomie-Systeme

Tabelle 2: Daten der beiden Osteotomie-Systeme

Name	Er:YAG-Laser [24]	Piezelektrisches System [40]
	Erbium-Yttrium-Aluminum Granat	Oberflächenhärtung mit Nitrotitan-Veredelung
Firma	Fotona , Ljubljana, Slowenien	Mectron , Filiale Schweiz, Le Sentier
Handstück-Modell	R02-C (Code 69020) (Gerät Fidelis Er II)	OT7 (Best. Nr. 03370007)
Power [W] (Leistung im Handgriff)	4-8 W	16 W
Oszillierende Frequenz [kHz]		24-29 kHz
Amplitudengrösse [μm]		60-210 μm
Pulse energy [mJ]	50-200 mJ	
Pulse duration [μs]	50-300 μs	
Pulse repetitions rate [Hz]	10-20 Hz	
Wellenlänge [nm]	2940 nm	
Spot size [mm]	0.9 mm	
Peristaltikpumpe [ml/min]	Sprühdrüse inkorporiert	15-100 ml/min
Arbeitsdistanz [mm]	7 mm	Direktkontakt
Bild	Fig. 1	Fig. 2

3.3. Versuchstiere

Alle 24 für die Studie verwendeten Schafe waren adult, entweder zwei- oder dreijährig (Durchschnitt: 2.25 Jahre alt), und weiblich. Das Alter der Schafe wurde anhand der Zähne beurteilt. Das Körpergewicht belief sich zwischen 49 bis 75 kg (Durchschnitt: 62.9 kg). Die Tierversuche wurden nach den Bestimmungen der schweizerischen Tierschutzgesetzgebung durchgeführt und vom kantonalen Veterinäramt bewilligt (Bewilligungsnummer 14/2006).

3.4. Vorbereitung der Versuchstiere

Eine Ankaufsuntersuchung wurde bei allen neu erworbenen Schafen durchgeführt. Mittels Vacutainersystem (greiner bio-one GmbH, Kremsmünster, Österreich) wurde den Schafen 2ml Blut entnommen, um es am Virologischen Institut der Vetsuisse-Fakultät Bern serologisch auf Maedi/Visna-Antikörper zu untersuchen. Die entsprechenden Tiere standen unter Quarantäne bis das Resultat bekannt war. Positive Tiere wurden gekeult. Im weiteren

wurden die Antiparasitika Albendazol p.o. (Valbazen® 1.9 %; 4 ml/10 kg; Pfizer AG, Zürich, Schweiz) und Toltrazuril p.o. (Baycox® 5 %; 0.7 ml/2 kg; Provet AG, Lyssach, Schweiz) sowie Ovilis® Heptavac P s.c. (2 ml/Tier; Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) gegen bakterielle Infektionen (Clostridien- und Pasteurelleninfektion) verabreicht. Die Impfung musste zur Grundimmunisierung nach 4-6 Wochen wiederholt werden. Zudem wurden die Tiere mittels Ultraschall auf Trächtigkeit untersucht. Tiere mit negativem Befund erhielten zweimalig im Abstand von 10 Tagen Prostaglandin F2- α (Dinoprost) s.c. (Dinolitic®; 2ml/Tier, Pfizer AG, Zürich, Schweiz) injiziert um mit Sicherheit eine Trächtigkeit während der Zeit der Studie auszuschliessen. Das weitere Management umfasst das Scheren zweimal im Jahr, das jährliche Impfen mit Ovilis® Heptavac P und das Entwurmen dreimal jährlich alternierend mit Valbazen®, Baycox® und Ivermectin s.c. (Ivomec®; 0.5 ml/25 kg; Biokema, Crissier-Lausanne, Schweiz) je nach Bedarf. In regelmässigen Abständen von 6 bis 8 Wochen wurden die Schafe einer Klauenpflege unterzogen. Bis zum Zeitpunkt des Projektbeginns lebten die Schafe in einer grossen Herde im Stall mit Weideauslauf.

Eine Woche vor der Operation wurden die Tiere in einen Stall des Tierspitals Zürichs eingestallt. Um allfällige Anästhesierisiken auszuschliessen, wurde den Tieren mittels Vacutainersystem Blut entnommen und dieses hämatologisch und chemisch im Labor der Vetsuisse-Fakultät Zürich untersucht. 24 Stunden vor der Operation wurden die Tiere in eine Boxe mit Hobelspänen eingestallt, wo sie freien Zugang zu Wasser hatten, aber kein Futter bekamen. Sie wurden gewogen und von oberhalb der Klaue bis zum Bereich der Hüfte und im Halsbereich geschoren. Weiter wurden Herz und Lunge auskultiert und die rektale Temperatur gemessen.

3.5. Operation

Die Schafe wurden mit Xylazin i.m. (Rompun® 2 %; 0.1 mg/kg; Provet AG, Lyssach, Schweiz) und Buprenorphin i.m. (Temgesic®; 0.3 mg/10 kg; Essex Chemie AG, Luzern, Schweiz) prämediziert.

Dreissig Minuten später wurden die Tiere in den Operationsraum geführt. Die geschorene Stelle am Hals wurde mit Hibiscrub®-Seife gewaschen, mit Alkohol (70 %) entfettet und mit Hibitane®-Tinktur (Zeneca AG, Luzern, Schweiz) desinfiziert. Zur Lokalanästhesie wurde 1ml Lidocain-Hyaluronidase 2 % (G.Streuli & Co AG, Uznach, Schweiz) subkutan an der Kathetereinstichstelle injiziert. Dann wurde ein Venenverweilkatheter (Vygonüle S® G14; Vygon GmbH; Aachen; Deutschland) in die Vena jugularis gelegt und ein IN-Stopper (Braun

Melsungen AG; Melsungen, Deutschland) als Verschluss aufgesetzt. Der Katheter wurde mit einem nicht resorbierbaren Nahtmaterial (Supramid® 2/0; Aesculap AG & Co, Tuttlingen, Deutschland) angenäht. Prä-operativ bekamen die Schafe zur Antibiose Benzylpenicillin i.v. (Penicillin Natrium; 30'000 I.U./kg; G.Streuli&Co AG, Uznach, Schweiz) und Gentamicin i.v. (Vetagent® 4 mg/kg; Veterinaria AG, Zürich, Schweiz), als nichtsteroidales Antiphlogistikum Carprofen i.v. (Rimadyl®; 4 mg/kg; Pfizer, Vertrieb Dr. E. Gräub AG, Bern, Schweiz). Zusätzlich wurde equines Tetanusantitoxin s.c. (Tetanus-Serum Intervet; 3000 I.U.; Veterinaria AG, Zürich, Schweiz) verabreicht.

Die Anästhesie wurde mit Ketamin i.v. (Narketan10®; 2 mg/kg; Vetoquinol AG, Belp-Bern, Schweiz) und Diazepam i.v. (Valium®; Roche Pharma AG, Rheinach, Schweiz) eingeleitet. Bei Bedarf wurde zusätzlich Propofol i.v. (2-4 mg/kg; Fresenius Kabi AG, Stans, Schweiz) injiziert. Der Kehlkopf wurde mit einem Sprühstoss Lidocain (Xylocain®Spray; 10mg/Tier; Astra Pharmaceutica AG, Dietikon, Schweiz) lokal anästhesiert und das Tier intubiert. Die Anästhesie wurde mit 1-1.5 % Isofluran (Forene®; Abbott AG, Baar, Schweiz) und Sauerstoff aufrechterhalten. Es wurde ein arterieller Ohrkatheter zur Blutgasmessung gelegt und eine Infusion mit Ringerlaktat an den Venenkatheter angehängt. Die Cornea wurde mit einer Augensalbe (Vitamin A Dispersa®; Novartis AG, Basel, Schweiz) vor Austrocknung geschützt. Die Operation erfolgte in Seitenlage. Das obere Hinterbein wurde nach craniodorsal ausgebunden und das untere, zu operierende Bein auf der Unterlage plan aufgelegt. Das Operationsfeld wurde nachgeschoren, mit Hibiscrub®-Seife gewaschen, mit Alkohol (70 %) entfettet, mit Hibitane®-Tinktur desinfiziert und mit sterilen Operationstüchern abgedeckt.

Der Zugang zur Tibia erfolgte von medial. Eine ca. 16 cm lange Hautinzision wurde gesetzt. Dann wurden die Subcutis und die Faszie bis auf die Tibia mit dem Kauter freipräpariert und die Blutungen gestillt. Die 11-Loch 3.5 mm LC-DCP (Synthes, Oberdorf, Schweiz) wurde auf die freiliegende Tibia gelegt und mittels eines Plattenbiegers (Synthes, Oberdorf, Schweiz) angepasst. Die Platte wurde fixiert, distal das zehnte Loch gebohrt, die Schraubenlänge gemessen, das Gewinde geschnitten und dann die Schraube eingedreht. Gleichermassen wurde proximal die zweite Schraube in exzentrischer Position gegen den Frakturspalt gerichtet (Abstützfunktion) gesetzt. Für die restlichen Schrauben des distalen Segmentes, ausser der frakturnahen (fünfte), wurde vorerst nur das Loch gebohrt, die Schraubenlänge gemessen und das Gewinde geschnitten. Mit dem Kauter wurde die Osteotomiestelle zwischen dem 5. und 6. Plattenloch angezeichnet. Dann wurden die zwei gesetzten Schrauben

wieder entfernt und die Platte beiseite gelegt. Das Periost an der Osteotomiestelle wurde mit einem Raspatorium entfernt. Zwei Hohmannhebel wurden von cranial und von caudal unter die Tibia gelegt. Mit dem Er:YAG bzw. Piezosurgery Gerät wurde unter Kühlung mit Kochsalzlösung die Tibia durchgesägt (Fig. 3, Fig. 4). Nach erfolgter Osteotomie wurde die Platte mit den Schrauben zehn und zwei verschraubt. Durch das Abtragen des Knochens während der Osteotomie und die Kompression der Frakturstelle war das Loch der zweiten Schraube inzwischen in eine neutrale Position gerutscht. Das Loch proximal der Osteotomiestelle (sechstes) wurde exzentrisch (Pfeil gegen die Fraktur) gebohrt, die Schraubenlänge gemessen, das Gewinde geschnitten und die Schraube eingedreht, womit eine Kompression im Frakturspalt (und somit eine Reduzierung der Fraktur) erzielt werden konnte. Alle anderen Schrauben wurden danach neutral gesetzt. Nach Beendigung der Fixation wurden die Faszie und die Subcutis je mit einer fortlaufenden Naht geschlossen. Dazu wurde ein resorbierbares Nahtmaterial (Polyglactin; Vicryl® 2-0; Johnson&Johnson Intl., Brüssel, Belgien) verwendet. Die Haut wurde mit Klammern verschlossen (Davis+Geck Appose ULC®; Vertrieb B. Braun Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland).

Danach wurden eine mediolaterale und eine caudocraniale Röntgenaufnahme gemacht (Fig. 5, Fig. 6). Zuletzt wurde ein Castverband angebracht, der wie folgt aufgebaut war: Zur Wundabdeckung wurde eine sterile Saugkomresse (Mesorb®; Mölnlycke Health Care AB, Göteborg, Sweden) benutzt. Es wurde mit unbeschichteter Watte gepolstert, mit einer elastischen Selbstklebebinde (Elastomull®haft; BSN medical GmbH & Co., Hamburg, Deutschland) fixiert, dann mit Papierkreppbinden (Cello-Crêpe®; IVF Hartmann AG, Neuhausen, Schweiz) umwickelt und darüber drei bis vier Rollen Castbinde (Scotchcast Plus® 7.6 cm; Laboratoires 3M Santé, Cergy Pontoise Cedex, Frankreich) gelegt. Darüber wurde als Schutz eine Pflasterbinde (Isoelast®; IVF Hartmann AG, Neuhausen, Schweiz) gewickelt und die Enden mit Tesaband (Tesa AG, Hamburg, Deutschland) festgeklebt. Die Schafe erhielten eine zusätzliche neue Ohrmarke mit projektbezogener Nummer und Farbe und wurden gechipt mit RF-Tags in sterilen Einwegspritzen von DATA MARS AG (RID® RF-Identification Technology, Bedano-Lugano, Schweiz).

Nach der Operation wurden die Schafe in die Boxe gefahren, in Brustlage gebracht und während der Aufwachphase beobachtet. Als bald sie wach wurden, bekamen sie Wasser und Heu angeboten. Am Tag der Operation wurden die Tiere mit Temgesic® 2x im Abstand von 4 Stunden analgetisch abgedeckt und antibiotisch mit der zweiten Dosis Penicillin Natrium versorgt. Die nächsten drei Tage erhielten sie ebenfalls die Antibiotika Penicillin Natrium und

Vetagent® sowie das nichtsteroidale Antiphlogistikum Rimadyl®. Danach wurde der Venenverweilkatheter entfernt.

3.6. Postoperativer Verlauf

8-Wochen Gruppe:

Zehn Tage postoperativ wurde den Schafen der Cast gewechselt und gleichzeitig die Hautklammern entfernt. Nach weiteren 4 Wochen, also 6 Wochen postoperativ insgesamt, wurde der Cast abgenommen und ein Robert Jones-Verband (=modifizierter Stützverband) angelegt. Vier Wochen postoperativ wurden zur Kontrolle je eine mediolaterale und eine craniocaudale Röntgenaufnahme angefertigt. Zur Fluoreszenzmarkierung [57] des neu gebildeten Knochens und der Sichtbarkeit des Remodellings wurde den Schafen nach 4 Wochen Calceingrün s.c. (1 ml/kg; Fluka AG, Buchs, Schweiz) und 3 Tage vor der Schlachtung Xylenolorange s.c. (1 ml/kg; Fluka AG, Buchs, Schweiz) injiziert.

12-Wochen Gruppe:

Ebenfalls 10 Tage postoperativ wurde den Schafen der Cast gewechselt und gleichzeitig die Hautklammern entfernt. Nach weiteren 4 Wochen, also 6 Wochen postoperativ insgesamt, wurde der Cast abgenommen und ein Robert Jones-Verband für 10 Tage angelegt, danach blieb das operierte Bein verbandfrei. Vier und acht Wochen postoperationem wurden zur Kontrolle je eine mediolaterale und eine craniocaudale Röntgenaufnahme angefertigt (Fig. 7, 8, 9). Zur Fluoreszenzmarkierung [57] des neu gebildeten Knochens und der Sichtbarkeit des Remodellings wurde den Schafen nach 4 Wochen Calceingrün s.c. (1 ml/kg; Fluka AG, Buchs, Schweiz), nach 8 Wochen Xylenolorange s.c. (1 ml/kg; Fluka AG, Buchs, Schweiz) und 3 Tage vor der Schlachtung Tetracyclin s.c. (Terramycin®/LA Long Acting, 1 ml/8 kg; Pfizer AG, Zürich, Schweiz) injiziert.

Alle Tiere lebten postoperationem zu sechst in einer grösseren Boxe. Die Klauen wurden regelmässig gepflegt.

3.7. Probenverarbeitung

3.7.1. Gewinnung und Aufbereitung der Proben

Die Schafe wurden nach 8 bzw. 12 Wochen geschlachtet. Sie wurden mit einem Bolzenschuss betäubt, am gesunden Hinterbein aufgehängt und entblutet. Die operierte Tibia wurde

freipräpariert und herausgetrennt. Die Schrauben wurden mittels eines 3.5 mm Schraubenziehers herausgedreht und die Platte wurde mit einem Meissel abgelöst. Die Tibia wurde sowohl mit, als auch ohne Platte von medial, lateral, cranial und caudal fotografiert (Sony Cyber-shot, DCS-P73, Sony Corp., Japan) (Fig. 11, 12, 13, 14). Danach wurde von mediolateral und von craniocaudal ein Röntgenbild angefertigt (55 kV, 5 s, 3 mA; Faxitron X-Ray Systems; Hewlett Packard, Mc Minnville Division, Oregon, USA) (Fig. 10). Mit einer Bandsäge (KOLBE Nirotechnik Maschinenbau, Riniker AG, Rapperswil, Schweiz) wurde je 1-2 cm proximal und distal der Osteotomiestelle zwischen dem fünften und sechsten Schraubenloch, die Tibia durchsägt. Danach wurden die Knochenklötzchen in Gläser mit 40 % Alkohol gegeben und eine Woche bei Zimmertemperatur darin konserviert.

Der nächste Verarbeitungsschritt war die Entwässerung der Knochenklötzchen mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe. Die Proben wurden zuerst in 50 % Alkohol gelegt, welcher dreimal im Abstand von 30 Minuten gewechselt wurde. Daraufhin wurden sie zweimal 12 h in 70 % Alkohol, zweimal 12 h in 80 % Alkohol, einmal 12 h in 90 % Alkohol, einmal 12 h in 96 % Alkohol und viermal 12 h in 100 % Alkohol entwässert. Es folgte eine vier Tage dauernde Entfettung unter Vakuum in Xylol bei Raumtemperatur. Das Xylol wurde nach dem ersten Tag gewechselt. Dann wurden die Proben eine Woche lang unter Vakuum bei 4 °C in Poly-Methylmetacrylat (PMMA) infiltriert. Zur Herstellung des PMMA wurden Methacrylsäuremethylester (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Buchs, Schweiz), Dibutylphthalat (Merck-Schuchardt OHG, Hohenbrunn, Deutschland) und Perkadox 16 (Dr.Grogg Chemie AG, Stetten, Schweiz) im Verhältnis 89.5 : 10 : 0.5 gemischt und im Glaskolben mit einem Magnetrührer während 15 min homogenisiert. Danach wurde das PMMA portionenweise in die Gläser mit den Proben verteilt. Eingebettet wurden die Proben in ihren Gläsern mit Deckel und mehrere Tage bei 4°C im Kühlschrank zur Polymerisation aufbewahrt. Falls sie nach 2 Wochen noch nicht polymerisiert waren, wurden die Proben in ein Wasserbad bei Raumtemperatur verbracht.

Nach Polymerisierung der Blöcke im Glas wurden die Gläser für ein paar Stunden ins Eisfach gelegt und danach das Glas um den Block herum mit einem Hammer entfernt. Die Blöcke wurden mit der Bandsäge geometrisch zugesägt und eine Aussparung auf der unteren Fläche angebracht zur Befestigung eines Plastikhalteschiffchens mittels Historesinplastikkleber. Bevor das Plastikhalteschiffchen befestigt werden konnte, wurden die Blöcke noch mit einer Schleifmaschine (Struers LaboPol 5, Kopenhagen, Dänemark) zugeschliffen, bestückt mit einem Sandpapier der Körnigkeit 220 (Waterproof Silicon Carbide Paper FEPA P#220, Struers A/S, Kopenhagen, Dänemark) und für den Feinschliff mit einem Papier der

Körnigkeit 2400 (Waterproof Silicon Carbide Paper FEPA P#2400, Struers A/S, Kopenhagen, Dänemark). Der Historesinplastikkleber setzt sich aus einem flüssigen (LEICA HISTORESIN Mounting Medium liquid component, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland) und einem pulverigen Bestandteil (LEICA HISTORESIN Mounting Medium powder component, Leica Microsystems, Nussloch, Deutschland) zusammen, welche jeweils frisch angemischt werden. Nachdem die Klötzchen auf den Plastikhalteschiffchen klebten, konnten sie in eine Präzisionsinnenlochsäge (Leica SP1600, Nussloch, Deutschland) eingespannt werden. Es wurden 400 µm breite Dickschnitte und 150 µm breite Fluoreszenzschnitte zugeschnitten. Die Fluoreszenzschnitte wurden zum Schutz der Farben vor lichtbedingtem Ausbleichen sofort in Aluminiumfolien verpackt. Die Schnitte wurden einen Tag mit Stahlplatten beschwert. Von den 400 µm Schnitten wurde, für allfällige spätere Identifikationsprobleme der Dick- und Fluoreszenzschnitte, eine Mikroradiographie (27 kV, 11 s, 3 mA; Faxitron X-Ray Systems; Hewlett Packard, Mc Minnville Division, Oregon, USA) angefertigt (Fig. 15). Danach wurden die 400 µm Schnitte mittels Schnellkleber (Cementit® CA 12, Merz+Benteli AG, Niederwangen, Schweiz) auf weisse Acropalträger und die 150 µm Fluoreszenzschnitte auf Glasobjektträger geklebt. Die 400 µm Schnitte wurden mit einer Schleif- und Poliermaschine (Planopol-V; Struers A/S, Rodovre, Dänemark) auf eine Dicke von ca. 300 µm geschliffen und einer Oberflächenfärbung mit Toluidinblau unterzogen (Fig. 16).

Die Klötzchen für die Dünnschnitte wurden mit einer kleinen Bandsäge (PROXXON Typ MBS 230/E No 27170, Niersbach, Deutschland) erneut zugesägt, sodass nur noch der Bereich um die Osteotomiestelle übrig blieb. Daraufhin wurden diese Reste in spezielle Teflonformen eingebettet, mit PMMA übergossen, mit den entsprechenden Gussdeckeln luftdicht zugeschraubt und im Wasserbad bei Raumtemperatur polymerisiert. Nach Aushärtung der Blöckchen wurden diesen wiederum mit dem Historesinplastikkleber die Halterschiffchen aufgebracht, ausgetrocknet und mittels Schraubstock aus den Formen gezogen. Mit der Präzisionsinnenlochsäge wurden die Blöckchen als Vorbereitung zur Herstellung von Dünnschnitten präzise angesägt. Anschliessend wurden mit einem Mikrotom (Leica® RM 2155; Leica Instruments GmbH, Nussloch, Deutschland) 5 µm dünne Schnitte angefertigt, welche dann mit Toluidinblau und der von Kossa Färbung mit McNeal's Tetrachrom Gegenfärbung eingefärbt wurden.

3.7.2. Untersuchungsmethoden

3.7.2.1. Makroskopische Auswertung

Makroskopisch wurde an der freipräparierten Tibia die Callusmenge, die Sichtbarkeit des Osteotomiespalt, die Oberflächenbeschaffenheit des Periosts, d.h. dessen Rauigkeit bzw. Glätte und die Blutungen im Periost beurteilt. Die vier Parameter wurden nach einem Scoring-System bewertet (Tabelle 3). Je tiefer die Punktzahl, desto fortgeschrittener die Heilung.

Tabelle 3: Scoring-System Makroskopie

1) Callusmenge			
0 kein	1 wenig	2 mässig	3 viel
2) Sichtbarkeit Osteotomiespalt			
0 nicht sichtbar	1 kaum sichtbar	2 mässig sichtbar	3 gut sichtbar
3) Oberflächenbeschaffenheit Periost			
0 glänzend	1 zT. aufgeraut	2 über gesamten Osteotomiespalt aufgeraut	
4) Blutungen			
0 keine	1 kaum	2 mässig	3 zahlreich

3.7.2.2. Radiologische Auswertung

Für die Bewertung der Röntgenbilder wurde ein Scoring-System entwickelt (Fig. 17), welches die periostale (nur im Trans-Cortex) und endostale Callusmenge und die Dichte des Knochens im Bereich des Osteotomiespalt im Trans- und Cis-Cortex beurteilt (Tabelle 4). Je höher die Punktzahl, desto fortgeschrittener die Heilung.

Die postmortalen Röntgenbilder wurden, nach Entfernung der Platte, mit einem Gerät höherer Auflösung gemacht (Faxitron X-Ray Systems, Hewlett Packard, Mc Minnville Division, Oregon, USA).

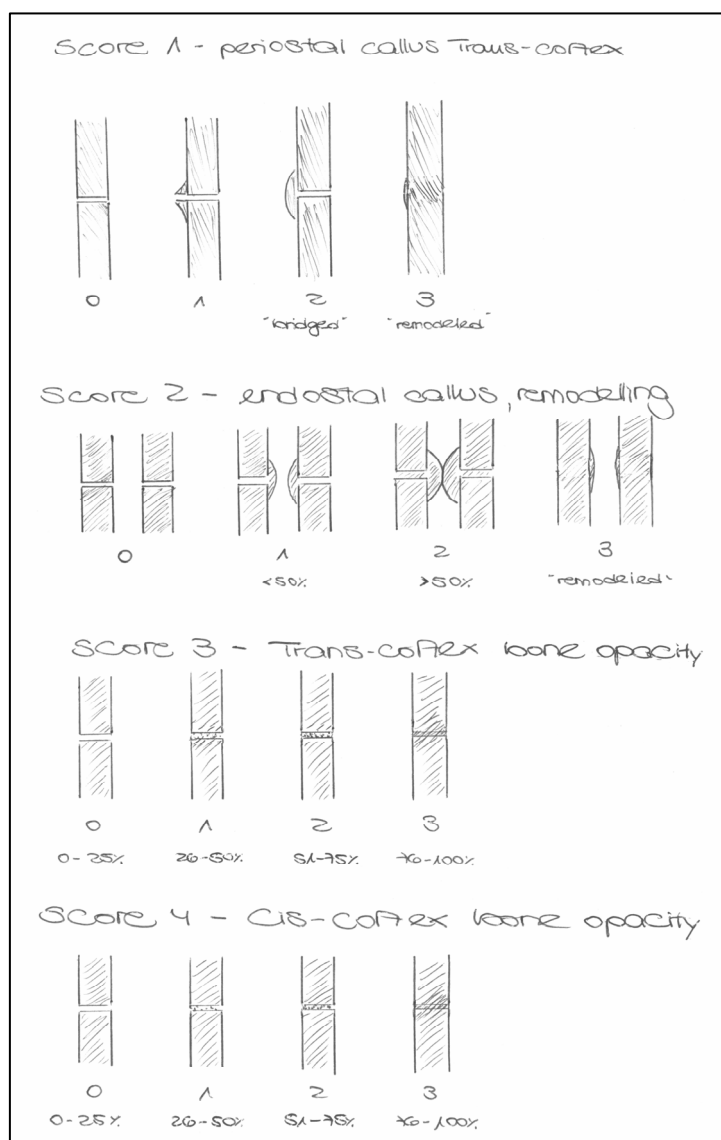


Fig. 17

Tabelle 4: Scoring-System Radiologie

1) periostale Callusmenge Trans-Cortex			
0 kein	1 mässig	2 überbrückt	3 remodeliert
2) endostale Callusmenge			
0 kein	1 <50 %	2 >50 %	3 remodeliert
3) Dichte des Knochens im Trans-Cortex			
0 0-25 %	1 26-50 %	2 51-75 %	3 76-100 %
4) Dichte des Knochens im Cis-Cortex			
0 0-25 %	1 26-50 %	2 51-75 %	3 76-100 %

3.7.2.3. Histomorphometrische Auswertung der Dickschnitte

Für die histomorphometrische Untersuchung wurden die Dickschnitte von einem Makroskop (Leica MZ16) bei 12.5-facher Vergrößerung über eine Kamera (Leica DC 480) mit Hilfe entsprechender Software (Leica IM 1000®) in einen Computer eingelesen. Pro Schnitt wurden jeweils ein Übersichtsbild. Im Bereich des Osteotomiespaltes mit der fünften und sechsten Schraube gemacht. Die bildbearbeitende Software Adobe Photoshop Elements 2.0 wurde benutzt, um das Gewebe des Dickschnittes wie folgt anzufärben: alte Knochenmatrix hellblau, neue Knochenmatrix dunkelgrün, Bindegewebe pink und Hintergrund beige (Fig. 18). Anschliessend wurde mit einem speziellen Computerprogramm (LEICA QWin V3, Win XP Layout) bei jedem Dickschnitt für jede Farbe die entsprechende Fläche berechnet und in einer Exceltabelle als Prozentwert angegeben.

3.7.2.4. Statistik der makroskopischen und radiologischen Auswertung und der Dickschnitte

Die Resultate wurden mit Hilfe der Statistik-Software SPSS (SPSS® 14.0 for Windows) analysiert. Die Daten der Histomorphometrie der Dickschnitte und die Daten der Scoring-Systeme der makroskopischen und radiologischen Auswertung wurden einem T-Test unterzogen, die Histomorphometrie der Dickschnitte zusätzlich einem factorial und repeated Anova-Test. Als statistisch signifikant wurden p-Werte <0.05 (= *) angesehen, ebenfalls bezeichnet wurden Signifikanzen $p < 0.01$ (= **) und $p < 0.001$ (= ***).

3.7.2.5. Qualitative Auswertung der Fluoreszenzschnitte

Für die qualitative Auswertung wurden die Fluoreszenzschnitte verwendet. Sie wurden mit einem Mikroskop der Firma ZEISS HBO 100 (AXIO Imager Z1) betrachtet und mit dem Computerprogramm AXIO Vision Rel 4.5 bei einer 25-fachen Vergrößerung abgerastert und eingezogen (angefertigt an der Tiermedizinischen Hochschule Hannover, Deutschland). Das heisst, dass jeder Schnitt für jede Wellenlänge, d.h. bei welcher der entsprechende Fluoreszenzfarbstoff emittiert, einzeln abgerastert wurde. Die 8-Wochen Gruppen wurden somit zweimal abgerastert, einmal nur für den Farbstoff Calceingrün und das zweite Mal nur

für den Farbstoff Xylenolorange und die 12-Wochen Gruppen noch ein drittes Mal nur für den Farbstoff Tetracyclin (Fig. 19, 20, 21, 22).

Grün stellt die Intravital-Färbung mit Calceingrün, orange diejenige mit Xylenolorange und gelblich-ocker jene mit Tetracyclin dar.

Beurteilt wurden die Farbverteilungen im Bereich des Osteotomiespaltes, d.h. Cis-Periost, Cis-Cortex, Cis-Endost, Trans-Endost, Trans-Cortex, Trans-Periost.

3.7.2.6. Qualitative Auswertung der Dünnschnitte

Die toluidinblau- und von Kossa-gefärbten Dünnschnitte wurden im Mikroskop der Firma Leica® (Leica®MDL 505097) betrachtet und qualitativ ausgewertet. Bei der Auswertung wurde auf das Erscheinen von enchondraler Ossifikation im Osteotomiespalt und umliegendem Callus, das Vorhandensein von Osteoklasten und der allgemeinen Qualität des Callusgewebes geachtet.

4. RESULTATE

4.1. Operation

Die Operation konnte bei allen 24 Schafen wie geplant durchgeführt werden und alle Tiere überstanden die Anästhesie komplikationslos. Die durchschnittliche Breite der Tibiae betrug 17.35 mm (16- 19 mm) und die durchschnittliche Höhe 21.21 mm (20-22mm). Die Osteotomien dauerten mit dem Er:YAG-Laser im Durchschnitt 228.25 s und mit dem Piezosurgery-Gerät 182.33 s.

Bei Schaf 1942 brach beim Bohren des Schraubenloches die Spitze des Bohrers ab und verblieb in der Höhe des vierten Loches von distal gesehen.

Durch weniger konstante Führung des Laserkopfes wurde bei den Schafen 1943 und 1948 der Osteotomieschnitt makroskopisch sichtbar gezackter als bei den anderen.

Bei Schaf 1955 entstand am Trans-Cortex ein kleines Knochenfragment auf Höhe der fünften Schraube von distal gesehen, d.h. auf Höhe des Osteotomiespaltes.

Bei den Schafen 1956 und 1964 wurde möglicherweise das Gelenk angebohrt, deshalb wurde bei Schaf 1956 keine Schraube und bei Schaf 1964 nur eine kürzere Schraube angebracht.

Das Schaf 1957 blutete intraoperativ stark obwohl eine kontinuierliche Blutstillung mit dem Elektrokauter vorgenommen wurde, dies aufgrund einer Blutung aus dem Knochenmark welche erfahrungsgemäss mit dem Kauter kaum gestillt werden können, da sich die Blutgefässe sofort in das Markinnere zurückziehen.

4.2. Verlauf

Der klinische Verlauf aller Schafe war postoperationem unauffällig und alle Operationswunden heilten per primam. Mehr als die Hälfte der Schafe (13/24) hatte sich unmittelbar nach der Operation den Katheter ausgerissen, den IN-Stopper verloren oder den Katheter so geknickt, dass er nicht mehr durchgängig war und gezogen werden musste.

Das Schaf 1957, welches intraoperationem viel Blut verloren hatte, erhielt einen Tag danach Infusionen i.v. verabreicht, weil es sich anfänglich schwach präsentierte.

Das Schaf 1949 entledigte sich am Abend der Operation zweimal des Casts, welcher somit unmittelbar postoperationem zweimal erneuert werden musste.

Die Schafe 1956 und 1958 entwickelten nach 6 Wochen eine Drucknekrose in der Afterklauenregion, welche jedoch nach 14-tägiger regelmässiger Wundtoilette abgeheilt war.

Das Schaf 1951 zeigte die ersten Tage postoperationem Unsicherheiten, mit dem Cast aufzustehen, d.h. es lag viel und frass dadurch weniger. Es wurde zur Kontrolle geröntgt (ohne besondere Befunde) und mehrmals täglich aufgestellt. Ebenfalls wurde ihm Kraftfutter zugefüttert. Nach einer Woche verhielt sich das Tier wie alle anderen und der weitere Verlauf war komplikationslos.

4.3. Makroskopische Befunde

8-Wochen Gruppe :

Bei allen Schafen war ein makroskopisch unterschiedlich grosser Callus feststellbar, wobei sich die Er:YAG-Gruppe nicht von der Piezosurgery-Gruppe unterschied. Die Osteotomiestelle war bei allen Schafen sichtbar, tendenziell bei der Piezosurgery-Gruppe besser als bei der Er:YAG-Gruppe. Das Periost erschien bei beiden Gruppen über dem ganzen Osteotomiespalt aufgeraut. Bezüglich der Menge der periostalen Blutungen unter der Platte schnitt die Piezosurgery-Gruppe deutlich besser ab.

Alle Implantate waren stabil und es konnten keine gelockerten Schrauben festgestellt werden..

12-Wochen Gruppe:

Bei der 12-Wochen Gruppe war kaum mehr Callus vorhanden. Die Osteotomiestelle der Piezosurgery-Gruppe war gar nicht mehr und bei der Er:YAG-Gruppe kaum mehr sichtbar. Das Periost war bei beiden Gruppen vorwiegend glatt und glänzend. Periostale Blutungen unter der Platte waren bei beiden Gruppen keine vorhanden.

Alle Implantate waren stabil und es konnten keine gelockerten Schrauben festgestellt werden.

Zwischen den 8- und den 12-wöchigen Gruppen ergaben sich bei beiden Osteotomie-Methoden bei allen erfassten Parametern signifikante Unterschiede ($p = 0.000$). Hingegen konnten zwischen den beiden Osteotomie-Methoden mit Ausnahme der geringeren periostalen Blutungen 2 Monate nach der Piezosurgery keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden.

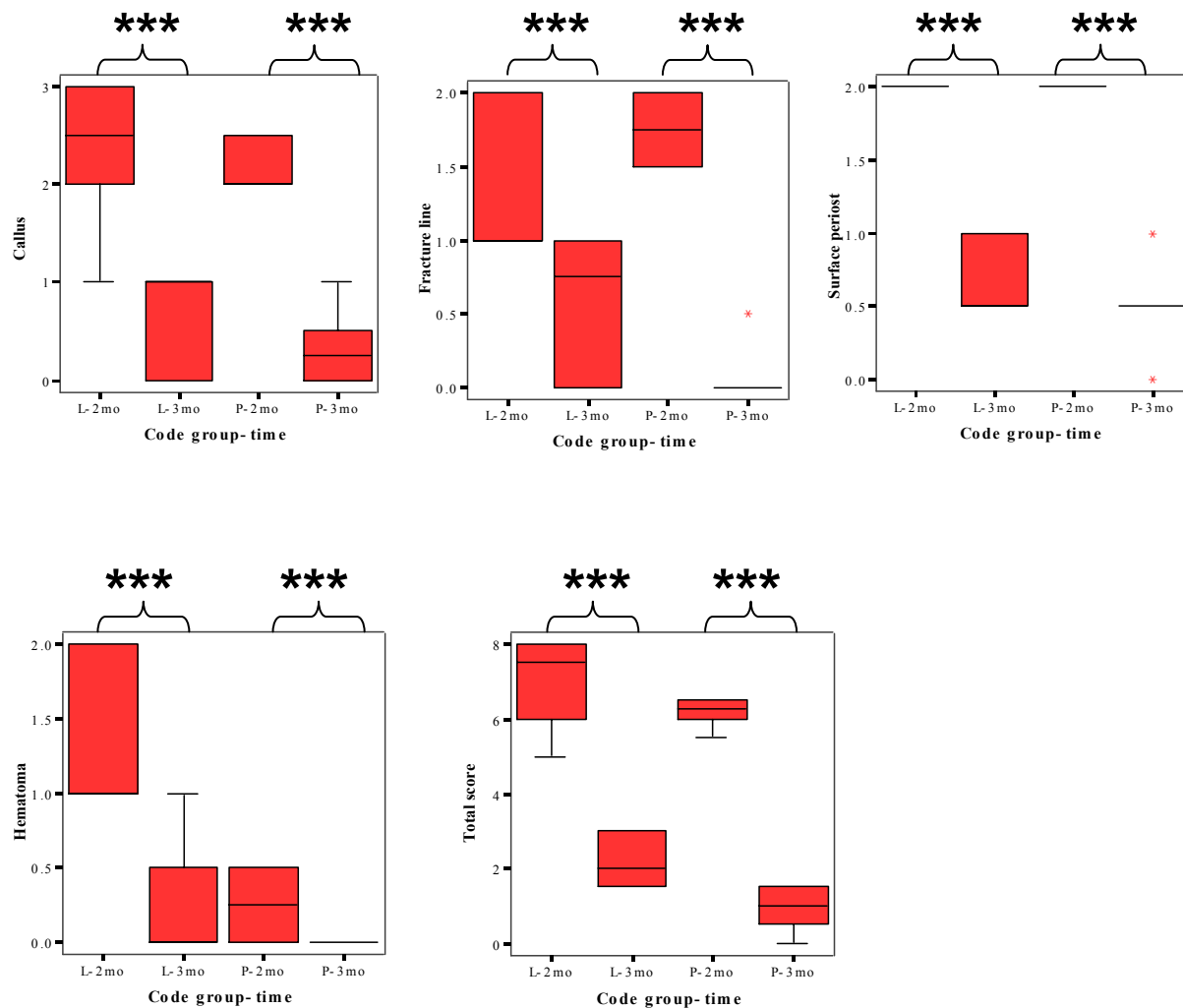


Fig. 31

Tabelle 5

Gruppe	Anzahl	Total Score	Callusmenge	Fx-Spalt	Periostglätte	Blutungen
Laser						
-2 Monate	6	7.00±1.3	2.33±0.8	1.33±0.5	2.00±0.0	1.33±0.5
-3 Monate	6	2.17±0.8	0.67±0.5	0.58±0.5	0.67±0.3	0.25±0.4
Piezo						
- 2 Monate	6	6.17±0.4	2.17±0.3	1.75±0.3	2.00±0.0	0.25±0.3
- 3 Monate	6	0.92±0.6	0.33±0.4	0.08±0.2	0.50±0.3	0.00±0.0

4.4. Radiologische Befunde

Sowohl innerhalb der 8-wöchigen wie auch innerhalb der 12-wöchigen Gruppe zeigte sich die Heilung radiologisch ähnlich. Wenn aber die 8- mit der 12-Wochen Gruppe verglichen wurde, konnte festgestellt werden, dass bei den 12-wöchigen radiologisch kaum mehr Callus sichtbar war, was für ein weit fortschrittenes Remodelling spricht. Der periostale Callus am Trans-

Cortex erschien meist schon überbrückt oder sogar schon vollständig rekonstruiert, ebenso im Bereich des endostalen Callus. Im Weiteren entsprach die Knochendichte am Trans- bzw. Cis-Cortex beinahe normale Werten und der Osteotomiespalt war kaum mehr identifizierbar.

Zwischen den 8- und 12-wöchigen Gruppen ergaben sich bei beiden Osteotomie-Methoden bei allen erfassten Parametern signifikante Unterschiede während zwischen den Osteotomie-methoden zum gleichen Zeitpunkt keine signifikanten Unterschiede gezeigt werden konnten.

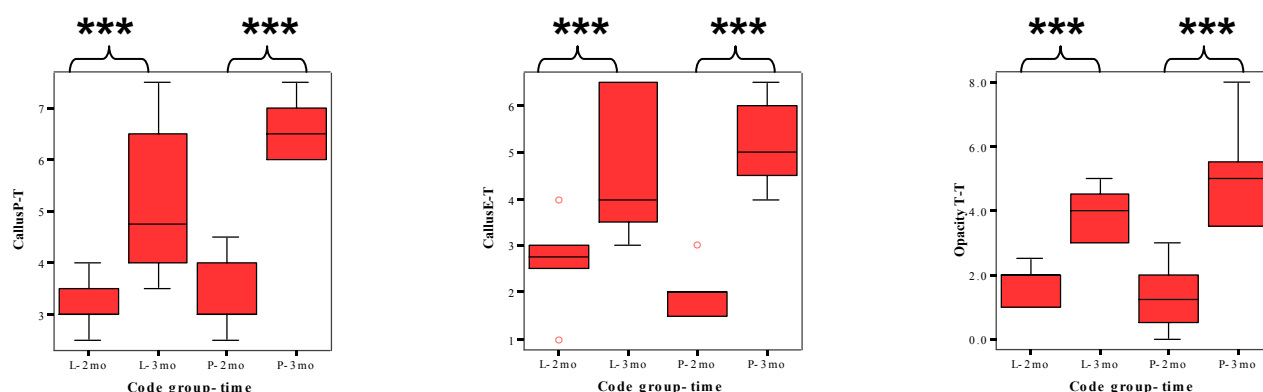


Fig. 32

Tabelle 6

Gruppe	Anzahl	Callus Periost	Callus Endost	Fx-Spalt Dichte Transcortex	Fx-Spalt Dichte Ciscortex
Laser					
-2 Monate	6	3.17±0.5	2.67±1.0	1.75±0.6	1.50±0.8
-3 Monate	6	5.17±1.5	4.58±1.5	3.92±0.9	3.08±0.7
Piezo					
- 2 Monate	6	3.33±0.8	2.00±0.6	1.33±1.1	0.75±0.7
- 3 Monate	6	6.58±0.7	5.17±0.9	5.08±1.7	3.50±1.1

4.5. Histomorphometrische Resultate

Bei den histologisch ausgewerteten Dickschnitten gab es sowohl innerhalb der beiden 8- als auch innerhalb der beiden 12-Wochen Gruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der ausgewerteten Fläche.

Im Weiteren bestand bei beiden 12-wöchigen Gruppen eine klare Tendenz, dass weniger alter Knochen und dafür mehr bindegewebige Strukturen vorhanden waren als bei den 8-wöchigen Gruppen.

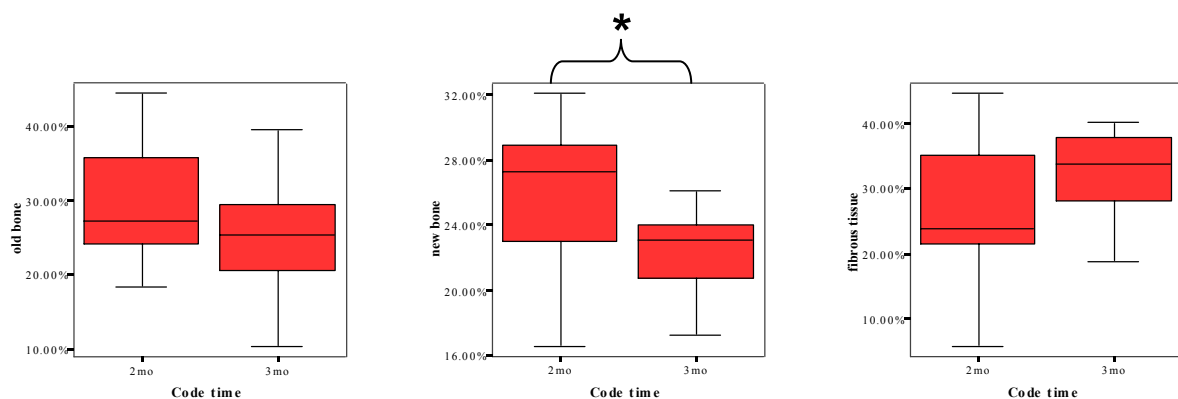


Fig. 33: Histomorphometrie des Er:YAG Lasers

Tabelle 7: Histomorphometrie des Er:YAG Lasers

Gruppe	Anzahl	Alte Matrix %	Neue Matrix %	Bindegewebe %	Undefiniert %
Laser					
-2 Monate	6	29.61±7.9	25.75±5.1	25.69±11.5	8.67±3.9
-3 Monate	6	25.18±8.8	22.23±2.7	32.26±6.8	10.18±3.9

Undefinierte %: Hier handelt es sich um Areale, die aus schnitttechnischen Gründen nicht angefärbt wurden, deshalb den anderen Komponenten nicht zugeordnet und im weiteren bei der Auswertung nicht mehr berücksichtigt werden konnten.

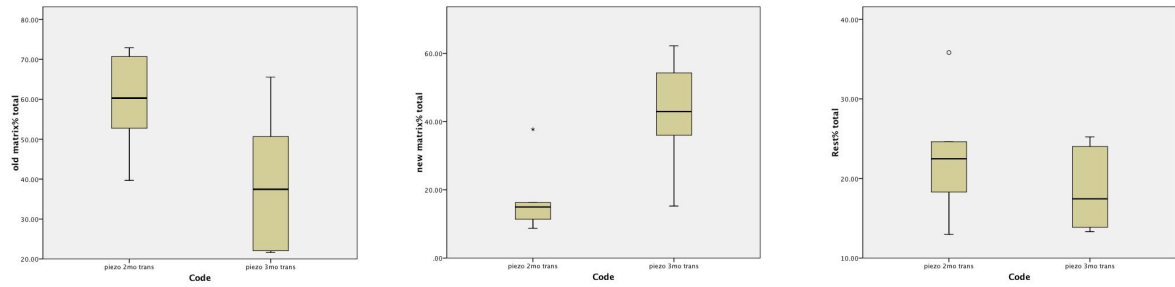


Fig. 34: – Histomorphometrie des Piezosurgery Gerätes

Tabelle 8: Histomorphometrie des Piezosurgery Gerätes

Gruppe	Anzahl	Alte Matrix %	Neue Matrix %	Rest %
Piezo				
-2 Monate	6	59.26±16.4	17.75±4.2	22.85±8.5
-3 Monate	6	39.14±20.2	41.25±13.7	18.55±5.2

4.6. Qualitative Resultate

Fluoreszenzschnitte:

Sowohl innerhalb der 8- als auch innerhalb der 12-Wochen Gruppen zeigte sich bezüglich der Aufnahme der Fluoreszenzfarbstoffe in die Knochenmatrix ein einheitliches Bild.

Alle Farbstoffe fluoreszierten in den erwarteten Tönen, d.h. bei den 8-Wochengruppen hellgrün und orange und bei den 12-Wochengruppen hellgrün, orange und ocker.

Beim hellgrün fluoreszierenden Farbstoff handelt es sich um das Calceingrün, welches einen Monat postoperationem injiziert wurde. Somit ist das der erste applizierte Farbstoff und markiert die älteste Phase im Knochenremodeling.

Beim orange fluoreszierenden Farbstoffe handelt es sich um das Xylenolorange, welches nach zwei Monaten postoperationem injiziert wurde und somit die zweitälteste Phase markiert.

Tetracyclin ist der ocker fluoreszierenden Farbstoff, welcher bei der 12-Wochen Gruppe nach drei Monaten appliziert wurde und somit die jüngste Phase des Knochenremodelings markiert.

Die Fluoreszenzmarkierungen stimmen mit der zeitlichen Dynamik des kalkhaltigen Gewebes in allen Schnitten überein. So fluoreszieren die am tiefsten liegenden Schichten, deren Mineralisationsphase am längsten zurückliegen, hellgrün.

Im Weiteren zeigt sich, dass wiederum innerhalb der 8-Wochen Gruppe und innerhalb der 12-Wochen zwischen den einzelnen Schnitten kaum Unterschiede bestehen.

Dünnschnitte:

In den mit Toluidinblau angefärbten Dünnschnitten präsentiert sich der alte noch verbliebene Knochen hellblau und der neu gebildete dunkelblau. In den mit von Kossa gefärbten Dünnschnitten färbt sich das calcifizierte Gewebe schwarzbraun, die Zone der enchondralen Ossifikation hellblau, die Zellen (Osteoblasten und -klasten) dunkelblau und Knorpel hellviolett an.

8-Wochen Gruppe:

Der Bereich um den Osteotomiespalt zeigte sich bei allen Proben der 8-Wochen Gruppen unorganisiert und ohne einheitliche Struktur (Fig. 30). Vor allem im periostalen Bereich und auf der plattenfernen Seite wurde Callusgewebe gefunden. Im periostalen Bereich waren somit grössere Areale enchondraler Ossifikation zu sehen als im Endostalen. Das Callusgewebe selbst bestand aus Geflechtknochen, sogenanntem Woven Bone [33], mit vielen aktiven quer zur Frakturlinie gerichteten Lakunen, sogenannten Cutting Cones [64; 66], welche Osteoide bildeten. Die Säume der Osteoide waren noch relativ dünn, jedoch bedeckt von Osteoblasten, welche pallisadenartig aufgereiht den Osteoidsäumen aufsitzen. Auf der mineralisierten Knochenoberfläche sitzen Osteoklasten, welche durch Fusionierung von überall vorhandenen Makrophagen entstanden waren und die Knochenoberfläche resorbieren (Fig. 27, 28, 29). Longitudinale Lakunen konnten kaum gesehen werden und Lamellenknochen war ebenfalls wenig vorhanden.

12-Wochen Gruppe:

Bei allen Proben der 12-Wochen Gruppen zeigte sich ein weit fortgeschrittenes Remodelling und ein organisierteres Bild (Fig. 25) im Vergleich zu den 8-Wochen Gruppen. Vor allem auf der plattenfernen Seite waren grosse, longitudinale Lakunen zu sehen (Fig. 23), welche sich sehr aktiv mit dicken Osteoidsäumen und mit viel eingelagertem Calcium, vielen Osteoklasten und -blasten zeigten (Fig. 24) [2; 35; 62]. Auf der plattennahen Seite waren die Lakunen weniger gross, zahlreicher und dichter. Vereinzelt waren hier auch Zonen sich umbildender Querlakunen zu finden welche sich in longitudinale Lakunen umorganisierten (Fig. 26), was einem Gap-Healing mit beginnender Längsmodellierung entspricht. Endostal

wurden wenige Knocheninseln gefunden, welche in Knochenmark umgeformt wurden und von Fettzellen umgeben waren. Meisten war das Knochenmark bereits vollständig rekonstruiert. Die Frakturlinien waren nicht mehr eindeutig identifizierbar und Lamellenknochen war deutlich sichtbar.

5. ABBILDUNGEN



Fig. 1:
Er:YAG Laser



Fig. 3:
Er:YAG Laser intra-OP



Fig. 2:
Piezosurgery

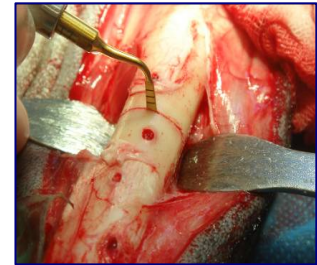


Fig. 4:
Piezosurgery intra-OP

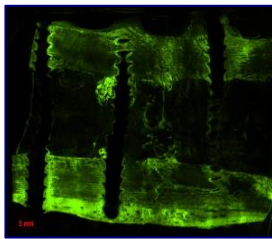


Fig. 19:
Fluoreszenzsnchnitt
Calceingrün
Er:YAG, 12 Wochen

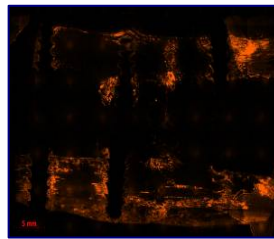


Fig. 20:
Fluoreszenzsnchnitt
Xylenolorange
Er:YAG, 12 Wochen

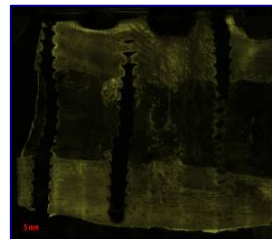


Fig. 21:
Fluoreszenzsnchnitt
Tetracyclin
Er:YAG, 12 Wochen

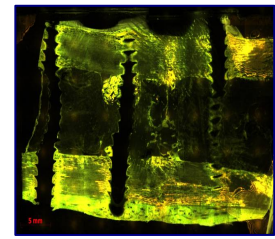


Fig. 22:
Fluoreszenzsnchnitt
Calceingrün, Xylenolorange,
Tetracyclin
Er:YAG, 12 Wochen

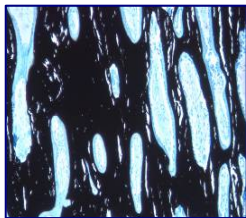


Fig. 23:
Dünnschnitt, gefärbt mit
von Kossa, Trans-Cortex;
Riesige Längslakunen
d.h. sehr aktives Remodelling
Er:YAG, 12 Wochen

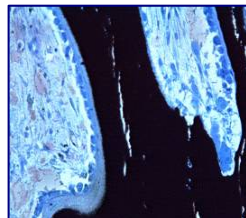


Fig. 24:
Dünnschnitt, gefärbt mit
von Kossa, Trans-Cortex;
Dicke Osteoidsäume mit Osteo-
blasten, -klasten und Makro-
phagen und Calciumdepo-
nierungen
Er:YAG, 12 Wochen

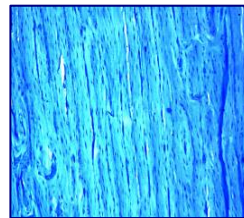


Fig. 25:
Dünnschnitt, gefärbt mit
Toluidinblau, Trans-Cortex;
Ruhige, geordnete
Lamellenstruktur längs
Er:YAG, 12 Wochen

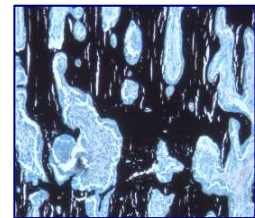


Fig. 26:
Dünnschnitt, gefärbt mit
von Kossa, Cis-Cortex;
Querlamellen, die sich
umformen zu Längslamellen
d.h. Beginn Remodeling nach
Gap Healing
Er:YAG, 12 Wochen

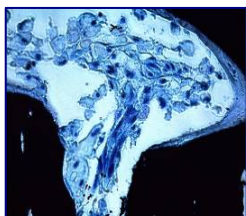


Fig. 27:
Dünnschnitt, gefärbt mit
von Kossa, Cis-Cortex;
Umsetzung von Knocheninseln
d.h. viele gedunsene Makrophagen
fusionierend zu Osteoklasten
Er:YAG, 8 Wochen

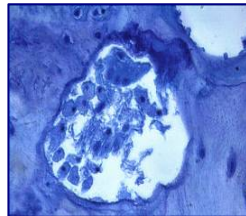


Fig. 28:
Dünnschnitt, gefärbt mit
Toluidinblau, Cis-Cortex;
Fusion von vollgefressenen
Makrophagen zu Osteoklasten
Er:YAG, 8 Wochen

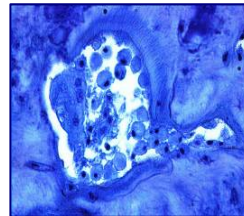


Fig. 29:
Dünnschnitt, gefärbt mit
Toluidinblau, Cis-Cortex;
Fusion von vollgefressenen
Makrophagen zu Osteoklasten
Er:YAG, 8 Wochen

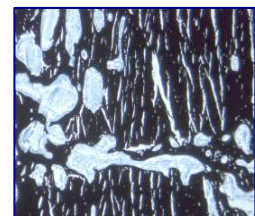


Fig. 30:
Dünnschnitt, gefärbt mit
von Kossa, Fx-Linie;
Unruhige, chaotische Zone
von Quer- und Längslamellen
Er:YAG, 8 Wochen



Fig. 5:
post-OP
mediolateral
Er:YAG, 12 Wochen



Fig. 6:
post-OP
caudocranial
Er:YAG, 12 Wochen

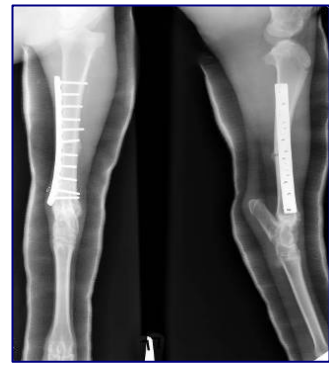


Fig. 7:
Craniocaudal mediolateral
Vier Wochen post-OP
Er:YAG, 12 Wochen



Fig. 8:
Acht Wochen post-OP
Mediolateral
Er:YAG, 12 Wochen



Fig. 9:
Acht Wochen post-OP
Craniocaudal
Er:YAG, 12 Wochen

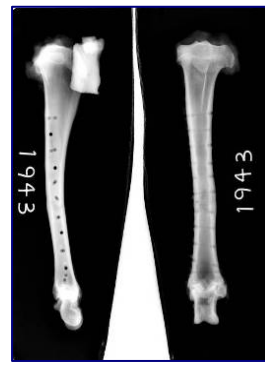


Fig. 10:
Mediolateral craniocaudal
Zwölf Wochen post-OP
Er:YAG, 12 Wochen



Fig. 11:
post-mortem, mediolateral
Er:YAG, 12 Wochen



Fig. 12:
post-mortem, lateromedial
Er:YAG, 12 Wochen



Fig. 13:
post-mortem, craniocaudal
Er:YAG, 12 Wochen



Fig. 14:
post-mortem, caudocranial
Er:YAG, 12 Wochen

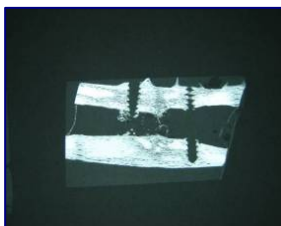


Fig. 15:
Mikroradiographie, Dickschnitt
Er:YAG, 12 Wochen

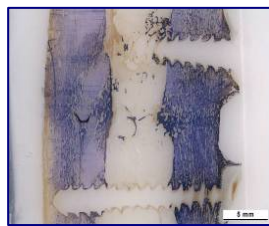


Fig. 16:
Dickschnitt, gefärbt mit
Toluidinblau
Er:YAG, 12 Wochen

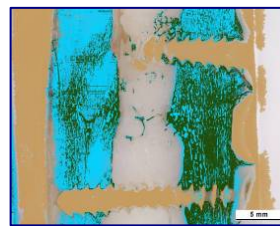


Fig. 18:
Dickschnitt, coloriert mit
Adobe Photoshop
Er:YAG, 12 Wochen

6. DISKUSSION

Das Ziel dieser Studie war den Einfluss von zwei verschiedenen Osteotomiemethoden auf die Knochenheilung bzw. knöcherne Regeneration nach einer Osteotomie zu beurteilen. Die beiden Methoden haben grundsätzlich verschiedene Eigenschaften: bei der einen handelt es sich um ein laser- und bei der anderen um ein ultraschallbasiertes Gerät. Trotz der unterschiedlichen Ausgangssituation zeigte der Vergleich der Methoden nach Tibiaosteotomien eine ähnlich gute Knochenheilung innerhalb von 8 bzw. 12 Wochen gemessen an der Überbrückungen des Osteotomiespaltes und am Remodelling.

6.1. Versuchsmodell

Weil sowohl die Knochenphysiologie als auch das Körpergewicht des adulten Schafes weitgehend mit jenen des Menschen vergleichbar sind, wird das Schaf häufig als Modell für Untersuchungen am Bewegungsapparat, zum Studium von Frakturheilungstendenzen und zur Evaluation neuer Osteosyntheseverfahren eingesetzt [8; 49; 50; 56; 66].

Ein weiterer sehr wichtiger Punkt ist, dass die Geschwindigkeit des Heilungsvorganges, also der konstant ablaufende Regenerationsprozess des Knochens, zeitlich ungefähr dem des Menschen entspricht.

Schafmodelle sind auch bezüglich des logistischen und finanziellen Aufwands vorteilhaft. Die als Fluchttier angeborene Überlebensstrategie der Scheue und Schreckhaftigkeit kann mit entsprechend überlegtem und angepasstem Handling (Sheepmanship) gut Rechnung getragen werden.

6.2. Operation und Verlauf

Die Operation verlief bei allen Tieren komplikationslos und alle Tibiae konnten problemlos durchtrennt werden, mit dem Er:YAG Laser in einer durchschnittlichen Zeit von 228.25 s und dem Piezosurgery Gerät in einer durchschnittlichen Zeit von 182.33s. Der Durchschnitt der Tibiabreite betrug 17.35 mm und deren Höhe 21.21 mm.

Das Castwechseln mit den Intervallen von 10 Tagen und 6 Wochen postoperativ hat sich bewährt. Da die Schafe von Anfang an freilaufend waren, d.h. nicht in einem Suspensions-System aufgehängt wurden und das casten intraoperativ aufgrund mangelndem bzw. herabgesetztem Muskeltonus erschwert war, ist der erste Castwechsel nach 10 Tagen optimal

angesetzt, um nicht genügend straffanliegende Casts zu ersetzen. Der Aufwand von 3-4 Castbinden pro Schafbein zahlte sich insofern aus als kein Castbruch zu verzeichnen war.

Die Tatsache dass die Schafe postoperativ ohne Suspensions-Systeme gehalten wurden und somit die operierte Gliedmasse vom ersten Tag an belasteten, scheint sich vorteilhaft auf die Osteogenese ausgewirkt zu haben. Das kann dadurch erklärt werden, dass die Regelmechanismen der Innervation, Vaskularisation und mechanisch wirkenden Muskelkontraktionen aktiviert und so die Heilungsgeschwindigkeit der Knochen beschleunigt wurde [27; 84].

Das während der Operation mit einem Raspatorium abgehobene Periost wurde nicht wieder aufgelegt, um eine effektive Knochenheilung ohne begünstigende Faktoren an dieser Stelle zu beobachten.

6.3. Probenaufbereitung und -auswertung

Die Aufbereitung der Proben mit dem beschriebenen Protokoll erwies sich als gut durchführbar. Alle hergestellten Schnitte waren von guter Qualität.

Bei keinem Tier war ein Implantatsversagen festzustellen wie auch keine Non-Union [9; 65], d.h. alle Osteotomiestellen waren bereits knöchern verbunden.

Die für die Histomorphometrie mit Adobe Photoshop Elements vorbereiteten Dickschnitte konnten problemlos identifiziert, angefärbt und ausgewertet werden. Der Osteotomiespalt war in allen Proben klar abgegrenzt und somit definierbar. Folglich konnten Ungenauigkeiten vermieden werden und das Endergebnis der Auswertung ist entsprechend verlässlich.

Beim Herstellen der Fluoreszenzschnitte mit der Innenlochsäge zerbrachen zwei Schnitte, da die Schnittdicke von 50 µm zu dünn war. Es musste deshalb eine Schnittdicke von 100 µm gewählt und die Schnitte anschliessend von Hand heruntergeschliffen werden. Die Schnitte konnten schlussendlich vollumfänglich verwendet werden. Dank der digitalisierten Version eines jeden einzelnen fluoreszierenden Schnittes konnte die qualitative Auswertung problemlos vorgenommen werden, weil sich so die Farben nicht gegenseitig überlagerten.

Die Dünnschnitte wurden übersichtsmässig beurteilt, mit Bestätigungen der histologischen Kriterien im Detail. Da klare Aussagen über den Einfluss der verschiedenen Osteotomiemethoden auf deren Heilungstendenzen gemacht werden konnten, schien diese Art der Auswertung absolut ausreichend.

6.4. Radiologische Auswertung

Die radiologische Kontrolle in 4-wöchigem Abstand hat sich bewährt, da so der Heilungsprozess im monatlichen Abstand gut dokumentiert werden konnte. Sowohl bei der Er:YAG- als auch bei der Piezosurgery-12-Wochen Gruppe war nur schon aufgrund dieser Bilder ein excellenter Heilungsverlauf festzustellen, d.h. beide zeigten radiologisch einen kaum mehr vorhandenen Callus.

Die Heilung des Periosts auf der plattennahen Seite (= Cis-Cortex) zeigte eine deutlich verzögertere Heilung im Vergleich zur plattenfernen Seite (= Trans-Cortex). Das heisst, dass auf der plattennahen Seite die übliche Callusbildung verzögert wurde wegen der darüberliegenden Platte und so im Bezug auf das Remodelling nicht gescort werden konnte und deshalb auf eine Beurteilung verzichtet wurde.

6.5. Histologische Auswertung

Sowohl innerhalb der 8-Wochen Gruppe als auch der 12-Wochen Gruppe waren keine wesentlichen Unterschiede zwischen den beiden Osteotomie-Techniken festzustellen, jedoch markante beim Vergleich der 8- mit der 12-Wochen Gruppe bezüglich dem Fortschritt des Remodellings.

Bei allen Schafen war eine primäre/direkte Knochenheilung, d.h. ein Gap healing, zu beobachten. Die Callusbildung um die Frakturfragmente kam durch die Elevation des Periostes während der Osteotomie zustande.

Das Gap healing und Remodelling war bei der 12-Wochen Gruppe im Trans-Cortex stärker ausgeprägt als im Cis-Cortex. Somit war auf der plattenfernen Seite die Callusbildung ausgeprägter als an der plattennahen Seite. Das kann dadurch erklärt werden, dass durch das Aufliegen der Platte auf dem Knochen die Callusbildung eher gehemmt bzw. verzögert wurde infolge verminderter Vaskularisation [21]. Der ursprünglich so genannte „Stress-Protection“ zugeschriebenen Wirkung, d.h. der verminderten mechanischen Belastung des Knochens unter der Platte und damit verbundener verminderter Anreiz zur Knochenheilung, konnte schon seit geraumer Zeit widerlegt werden [14; 22; 23]. Der Callus sah bei allen 12-Wochen Gruppen sehr geordnet, gut abgrenzbar und glatt umrandet aus und zeigte keinerlei Hinweise auf einen Irritationscallus bzw. eine gestörte Knochenheilung.

Bei den histologisch ausgewerteten Dickschnitten gab es innerhalb der 8- und der 12-Wochen Gruppen keine grossen Verschiedenheiten. Jedoch zeigte sich bei den 12-Wochen Gruppen

die Rekonstruktion viel weiter fortgeschritten und Knochenmarkshöhlen waren bereits in Bildung und somit das kompakte Callusgewebe im Trans-Bereich nicht mehr vorherrschend. Dass in diesen Gruppen weniger neuer Knochen vorhanden war, erklärt sich damit, dass der neugebildete Knochen an den Fragmentenden bereits wieder so rekonstruiert war, dass wie im normalen Knochen die mechanische Stabilität gegeben war. Deshalb war der Callus vollständig abgebaut und bereits remodeliert.

Innerhalb der 8-Wochen bzw. 12-Wochen Gruppen konnten keine markanten Unterschiede hinsichtlich der Aufnahme der Fluoreszenzfarbstoffe in die Knochenmatrix festgestellt werden. Sowohl bei der 12-Wochen Er:YAG- als auch bei der 12-Wochen Piezosurgery-Gruppe war deutlich weniger vom Farbstoff Calceingrün vorhanden als bei den beiden 8-Wochen Gruppen. Daraus lässt sich schliessen, dass bei diesen Tieren die Heilung insgesamt weiter fortgeschritten war und das ursprünglich eingebaute Calceingrün im Remodellingprozess bereits wieder abgebaut wurde. Bereits früher gemachte Studien bestätigen diese Beobachtungen, dass in den ersten 4 Wochen nach einer Fraktur in den corticalen Frakturenenden relativ wenig geschieht und die Knochenheilung vor allem zwischen 4-8 Wochen durch das Periost und Endost vorangetrieben wird [48; 56]. Nach einer ersten Resorptionsphase scheint die Überbrückung durch Gap healing und das Remodelling des Osteotomiespalt zu einer Heilung nach ungefähr 12 Wochen zu führen. Als Gap healing wurde das Einwandern von proliferierendem Callusgewebe quer zum Cortex, d.h. entlang dem Osteotomiespalt, definiert. Mit Remodelling ist das Einsprossen von sogenannten Cutting Cones längs zum Cortex, d.h. senkrecht zum Osteotomiespalt, gemeint.

Die in dieser Studie erhaltenen Resultate unterscheiden sich nicht massgebend von bereits publizierten Ergebnissen [10; 75; 78] und liegen somit für beide Osteotomiemethoden bezüglich histologischer Knochenheilung im Normbereich. Im Vergleich zu konventionellen oszillierenden Sägetechniken [78] sind die beiden getesteten Osteotomiemethoden sogar noch etwas besser, indem nach 3 Monaten eine deutliche verbesserte Rekonstruktion der Markhöhle und Heilung der Fragmentenden vorhanden war. Aber es handelt sich hierbei um den ersten Report über durchgeführte Osteotomien an langen Röhrenknochen mit einem Er:YAG Laser und einem piezoelektrischen Skalpell.

6.6. Statistik

Trotz der minimalen Anzahl von verwendeten Tiermodellen pro Gruppe konnten statistisch signifikante Unterschiede festgestellt werden. Dies war sehr erfreulich auch im Bezug auf die

Ethik und den Tierschutz, welchen so Rechnung getragen werden konnte. Aus den Resultaten konnten ordentliche Schlussfolgerungen für die klinische Relevanz gewonnen werden.

6.7. Schlussbeurteilung

Für beide Osteotomievarianten konnten sehr zufrieden stellende Ergebnisse verzeichnet werden.

Beide Methoden eignen sich für die Osteotomie, wobei, keine grundsätzliche Unterschiede festgestellt werden konnten. Das häufigere Auftreten von subperiostalen Hämatomen nach Osteotomie mittels dem Lasersystem kann mit der Schnittfeinheit erklärt werden, d.h. dass das Piezosurgery Gerät noch ein klein wenig feinere Osteotomieschnitte produziert.

Zwischen der 8. und der 12. Woche zeigte sich ein deutlicher Unterschied im Fortschritt der Knochenheilung. Dieser Zeitraum entspricht der Phase, in der allfällige Fehler deutlich werden könnten, wie zum Beispiel ungünstige Durchtrennung des Knochens oder schlechte Fixation der Implantate, was deren Lockerung oder Bruch zur Folge haben könnte. Da dies in der zugrunde liegenden Studie zu keiner Zeit der Fall war, kann davon ausgegangen werden, dass die beiden Techniken schonende und zukunftsweisende Methoden für künftige Osteotomien darstellen, sowohl im Bereich der langen Röhrenknochen wie auch der platten Gesichtsknochen.

6.8. Ausblick

Beide Osteotomiemethoden haben sich in dieser Studie bewährt. Vor allem die Methode mit dem Er:YAG Laser kann zukunftsweisend sein, da sein grösster Vorteil das berührungsunabhängige, kontaktlose Schneiden ist und somit auch gekurvt geschnitten werden kann. Dies wäre ein Meilenstein für die chirurgische Osteotomietechnik, gerade in der Maxillofacial-Chirurgie, wo das Wiederherstellen und plastische Konstruieren erheblich erleichtert würde. Gerade bei dünnen Knochen wie im Gesicht würde ein Laser vorteilhafter arbeiten als ein konventionelles Sägeblatt.

Diese Studie zeigte in einem ersten Schritt, dass einerseits lebender Knochen mit einem Laser geschnitten werden kann und andererseits die Heilungsvorgänge nicht verzögert werden. Im Gegenteil, die Heilungsvorgänge laufen deutlich rascher ab, verglichen mit einer mit einem herkömmlichen Sägeblatt, dies bestätigt auch ein Vergleich der Ergebnisse in der Dissertation von Alessa Waibel [78].

Für Folgestudien bietet sich die Möglichkeit mit einer gekurvten Schnittgeometrie zu arbeiten und Osteotomien nicht mehr an einem Röhrenknochen, sondern an einem flachen, platten Knochen durchzuführen an.

Die biologische Wertigkeit des dargestellten Verfahrens zur Knochendurchtrennung ist vor allem die tatsächlich erreichte Schonung der knöchernen Vaskularität und des umgebenden Weichteilmantels. Dies drückt sich letztendlich in der schnellen und unkomplizierten Knochenheilung aus, denn minimal dauernde und wenig invasive Techniken mindern das Infektionsrisiko, fördern die Heilung und garantieren ein gutes kosmetisches Ergebnis.

7. LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Baumgart, R., M. Kettler, et al. (1998). "[Indications and technique of bone cutting]." Chirurg **69**(11): 1188-96.
- 2 Benfu, C. and T. Xueming (1979). "Ultrastructural investigation of experimental fracture healing. I. Electron microscopic observation of cellular activity." Chin Med J (Engl) **92**(8): 530-5.
- 3 Bernard, M., M. Grothues-Spork, et al. (1996). "Reactions of meniscal tissue after arthroscopic laser application: an in vivo study using five different laser systems." Arthroscopy **12**(4): 441-51.
- 4 Bolander, M. E. (1992). "Regulation of fracture repair by growth factors." Proc Soc Exp Biol Med **200**(2): 165-70.
- 5 Bourque, W. T., M. Gross, et al. (1992). "A reproducible method for producing and quantifying the stages of fracture repair." Lab Anim Sci **42**(4): 369-74.
- 6 Brighton, C. T. (1984). "The biology of fracture repair." Instr Course Lect **33**: 60-82.
- 7 Buchelt, M., H. P. Kutschera, et al. (1994). "Erb:YAG and Hol:YAG laser osteotomy: the effect of laser ablation on bone healing." Lasers Surg Med **15**(4): 373-81.
- 8 Cheal, E. J., K. A. Mansmann, et al. (1991). "Role of interfragmentary strain in fracture healing: ovine model of a healing osteotomy." J Orthop Res **9**(1): 131-42.
- 9 Claes, L. E., C. A. Heigele, et al. (1998). "Effects of mechanical factors on the fracture healing process." Clin Orthop Relat Res(355 Suppl): S132-47.
- 10 Claes, L. E., H. J. Wilke, et al. (1995). "Effect of dynamization on gap healing of diaphyseal fractures under external fixation." Clin Biomech (Bristol, Avon) **10**(5): 227-234.
- 11 Clauser, C. (1986). "Comparison of depth and profile of osteotomies performed by rapid superpulsed and continuous-wave CO2 laser beams at high power output." J Oral Maxillofac Surg **44**(6): 425-30.
- 12 Clauser, C. and L. Clayman (1989). "Effects of exposure time and pulse parameters on CO2 laser osteotomies." Lasers Surg Med **9**(1): 22-9.
- 13 Collmann, H., N. Sorensen, et al. (1996). "Consensus: trigonocephaly." Childs Nerv Syst **12**(11): 664-8.
- 14 Cordey, J., S. M. Perren, et al. (2000). "Stress protection due to plates: myth or reality? A parametric analysis made using the composite beam theory." Injury **31 Suppl 3**: C1-13.
- 15 Cornell, C. N. and J. M. Lane (1992). "Newest factors in fracture healing." Clin Orthop Relat Res(277): 297-311.
- 16 Coutelier, L., A. Dhem, et al. (1963). "[Fluorescence Microscopy in the Study of Endochondral Ossification.]." Bull Acad R Med Belg **3**: 675-90.
- 17 Danis, R. (1949). Théorie et pratique de l'osteosynthèse Paris, Masson & Cie.
- 18 David, R., M. Nissan, et al. (1996). "Effect of low-power He-Ne laser on fracture healing in rats." Lasers Surg Med **19**(4): 458-64.
- 19 Eichfeld, U., A. Tannapfel, et al. (2000). "Evaluation of ultracision in lung metastatic surgery." Ann Thorac Surg **70**(4): 1181-4.

-
- 20 Farin, G. (1994). "Ultrasonic dissection in combination with high-frequency surgery." Endosc Surg Allied Technol **2**(3-4): 211-3.
- 21 Farouk, O., C. Krettek, et al. (1997). "Minimally invasive plate osteosynthesis and vascularity: preliminary results of a cadaver injection study." Injury **28 Suppl 1**: A7-12.
- 22 Field, J. R. (1997). "Bone Plate Fixation: Its Relationship with Implant Induced Osteoporosis." Veterinary Comparative Orthopaedics and Traumatology **10**: 88-94.
- 23 Field, J. R., T. C. Hearn, et al. (1997). "Bone plate fixation: an evaluation of interface contact area and force of the dynamic compression plate (DCP) and the limited contact-dynamic compression plate (LC-DCP) applied to cadaveric bone." J Orthop Trauma **11**(5): 368-73.
- 24 Fotona d.d. Manufactur Operator Manual - Er:YAG optical handpiece. Slovenia, www.fotona.si.
- 25 Frentzen, M., W. Gotz, et al. (2003). "Osteotomy with 80-micros CO2 laser pulses--histological results." Lasers Med Sci **18**(2): 119-24.
- 26 Friesen, L. R., C. M. Cobb, et al. (1999). "Laser irradiation of bone: II. Healing response following treatment by CO2 and Nd:YAG lasers." J Periodontol **70**(1): 75-83.
- 27 Frost, H. M. (1988). "The biology of fracture healing." J Clinical Orthopaedics and Related Research: 283-293.
- 28 Giraud, J. Y., S. Villemin, et al. (1991). "Bone cutting." Clin Phys Physiol Meas **12**(1): 1-19.
- 29 Gruber, R. M., F. J. Kramer, et al. (2005). "Ultrasonic surgery--an alternative way in orthognathic surgery of the mandible. A pilot study." Int J Oral Maxillofac Surg **34**(6): 590-3.
- 30 Hayda, R. A., C. T. Brighton, et al. (1998). "Pathophysiology of delayed healing." Clin Orthop Relat Res(355 Suppl): S31-40.
- 31 Hoigne, D. J., S. Stubinger, et al. (2006). "Piezoelectric osteotomy in hand surgery: first experiences with a new technique." BMC Musculoskelet Disord **7**: 36.
- 32 Ivanenko, M. (2005). "Ablation of hard bone tissue with pulsed CO2 lasers." Medical Laser Application **20**(1): 13-23.
- 33 Kaune, R. Knochenstoffwechsel. Physiologie der Haustiere, Enkeverlag.
- 34 Kimura, Y., D. G. Yu, et al. (2001). "Effects of erbium,chromium:YSGG laser irradiation on canine mandibular bone." J Periodontol **72**(9): 1178-82.
- 35 Klaushofer, K. and M. Peterlik (1994). "[Pathophysiology of fracture healing]." Radiologe **34**(12): 709-14.
- 36 Kotrikova, B., R. Wirtz, et al. (2006). "Piezosurgery--a new safe technique in cranial osteoplasty?" Int J Oral Maxillofac Surg **35**(5): 461-5.
- 37 Lewandrowski, K. U., C. Lorente, et al. (1996). "Use of the Er:YAG laser for improved plating in maxillofacial surgery: comparison of bone healing in laser and drill osteotomies." Lasers Surg Med **19**(1): 40-5.
- 38 McDavid, V. G., C. M. Cobb, et al. (2001). "Laser irradiation of bone: III. Long-term healing following treatment by CO2 and Nd:YAG lasers." J Periodontol **72**(2): 174-82.
- 39 McKbbin, B. (1978). "The biology of fracture healing in long bones." J Bone Joint Surg **60**: 150-162.
-

-
- 40 Mectron Medical Technology (2002). Piezoelectric Bone Surgery - Handbook, www.piezorugery.com oder www.mectron.com.
- 41 Metternich, F. U., S. Wenzel, et al. (2003). "[Surgical treatment of rhinophyma with the ultrasonic scalpel (Ultracision Harmonic Scalpel)]." Laryngorhinootologie **82**(2): 132-7.
- 42 Modis, L., M. Petko, et al. (1969). "Histochemical examination of supporting tissues by means of fluorescence. II. Fluorochromes as an indicator of lamellar bone mineralization." Acta Morphol Acad Sci Hung **17**(2): 157-66.
- 43 Muller, M. E. and S. M. Perren (1972). "[Callus and primary bone healing]." Monatsschr Unfallheilkd Versicher Versorg Verkehrsmed **75**(10): 442-54.
- 44 Müller, W., G. Fritzsche, et al. (1990). "Ultraschallinstrumente für chirurgische Zwecke - Technische Aspekte und ausgewählte Anwendungsgebiete." Ultraschall Med **11**: 76-80.
- 45 Nelson, J. R., I. Yow, et al. (1988). "Ablation of bone and methacrylate by a prototype mid infrared Erbium:YAG laser." Lasers Surg Med **8**: 494-500.
- 46 Nelson, J. S., A. Orenstein, et al. (1989). "Mid-infrared erbium:YAG laser ablation of bone: the effect of laser osteotomy on bone healing." Lasers Surg Med **9**(4): 362-74.
- 47 Niemz, M. H. (1995). "Cavity preparation with the Nd:YLF picosecond laser." J Dent Res **74**(5): 1194-9.
- 48 Nunamaker, D. M. (1998). "Experimental models of fracture repair." Clin Orthop Relat Res(355 Suppl): S56-65.
- 49 Nunamaker, D. M. and S. M. Perren (1977). "Cortical bone healing: Effects of implant size and mechanical application on bone healing with full weight bearing." Trans Orthop Res Soc **2**: 252.
- 50 Nunamaker, D. M. and S. M. Perren (1979). "A radiological and histological analysis of fracture healing using prebending of compression plates." Clin Orthop Relat Res(138): 167-74.
- 51 Nuss, C. R., R. L. Fabian, et al. (1988). "Infrared laser bone ablation." Lasers Surg Med **8**: 381-391.
- 52 Olerud, S. and G. L. Lorenzi (1970). "Triple fluorochrome labeling in bone formation and bone resorption." J Bone Joint Surg Am **52**(2): 274-8.
- 53 Payne, J. T., G. M. Peavy, et al. (2001). "Cortical bone healing following laser osteotomy using 6.1 microm wavelength." Lasers Surg Med **29**(1): 38-43.
- 54 Peavy, G. M., L. Reinisch, et al. (1999). "Comparison of cortical bone ablations by using infrared laser wavelengths 2.9 to 9.2 microm." Lasers Surg Med **25**(5): 421-34.
- 55 Perren, S. M. (1979). "Physical and biological aspects of fracture healing with special reference to internal fixation." Clin Orthop Relat Res(138): 175-96.
- 56 Perren, S. M. (2002). "Evolution of the internal fixation of long bone fractures. The scientific basis of biological internal fixation: choosing a new balance between stability and biology." J Bone Joint Surg Br **84**(8): 1093-110.
- 57 Rahn, B. A. (1976). Die polychrome Fluoreszenzmarkierung des Knochenbaus. ZEISS Informationen Sonderdruck. **85**.
- 58 Rahn, B. A. and P. Gallinaro (1971). "Primary bone healing. An experimental study in the rabbit." J Bone Joint Surg Am **53**(4): 783-786.
-

-
- 59 Rahn, B. A. and S. M. Perren (1971). "Xylenol orange, a fluorochrome useful in polychrome sequential labeling of calcifying tissues." Stain Technol **46**(3): 125-9.
- 60 Remberger, K. Knochen, Vorbemerkungen. Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie.
- 61 Rizoiu, I. M. and G. C. Levy (1994). "The efficiency of bone ablation with an Nd:YAG laser beam delivered with a cooling spray: an in vitro study." Compendium **15**(1): 106, 108, 110-1; quiz 112.
- 62 Rodan, G. A., J. K. Heath, et al. (1988). "Diversity of the osteoblastic phenotype." Ciba Found Symp **136**: 78-91.
- 63 Rupprecht, S., K. Tangermann, et al. (2003). "Er:YAG laser osteotomy directed by sensor controlled systems." J Craniomaxillofac Surg **31**(6): 337-42.
- 64 Schenk, R. and H. Willenegger (1963). "[on the Histological Picture of So-Called Primary Healing of Pressure Osteosynthesis in Experimental Osteotomies in the Dog.]" Experientia **19**: 593-5.
- 65 Schenk, R. K. (1978). Histology of fracture Repair and Non-Union. Bulletin Official Publication of the Swiss Association for the study of Internal Fixation, Bern.
- 66 Schenk, R. K. and H. R. Willenegger (1977). "[Histology of primary bone healing: modifications and limits of recovery of gaps in relation to extent of the defect (author's transl).]" Unfallheilkunde **80**(5): 155-60.
- 67 Siebert, W. (1993). "[Osteotomy with the experimental laser system].]" Fortschr Kiefer Gesichtschir **38**: 149-51.
- 68 Siebert, W. E. (1992). "[Use of lasers in arthroscopy].]" Orthopade **21**(4): 273-88.
- 69 Siervo, S., S. Ruggli-Milic, et al. (2004). "[Piezoelectric surgery. An alternative method of minimally invasive surgery].]" Schweiz Monatsschr Zahnmed **114**(4): 365-77.
- 70 Small, I. A., T. P. Osborn, et al. (1979). "Observations of carbon dioxide laser and bone bur in the osteotomy of the rabbit tibia." J Oral Surg **37**(3): 159-66.
- 71 Spencer, P., J. M. Payne, et al. (1999). "Effective laser ablation of bone based on the absorption characteristics of water and proteins." J Periodontol **70**(1): 68-74.
- 72 Stein, E., T. Sedlacek, et al. (1990). "Acute and chronic effects of bone ablation with a pulsed holmium laser." Lasers Surg Med **10**(4): 384-8.
- 73 Stubinger, S., J. Kuttenger, et al. (2005). "Intraoral piezosurgery: preliminary results of a new technique." J Oral Maxillofac Surg **63**(9): 1283-7.
- 74 Suzuki, H. K. and A. Mathews (1966). "Two-color fluorescent labeling of mineralizing tissues with tetracycline and 2,4-bis[N,N'-di-(carbomethyl)aminomethyl] fluorescein." Stain Technol **41**(1): 57-60.
- 75 Tepic, S., A. R. Remiger, et al. (1997). "Strength recovery in fractured sheep tibia treated with a plate or an internal fixator: an experimental study with a two-year follow-up." J Orthop Trauma **11**(1): 14-23.
- 76 Vercellotti, T. (2004). "Technological characteristics and clinical indications of piezoelectric bone surgery." Minerva Stomatol **53**(5): 207-14.
- 77 Vercellotti, T., S. De Paoli, et al. (2001). "The piezoelectric bony window osteotomy and sinus membrane elevation: introduction of a new technique for simplification of the sinus augmentation procedure." Int J Periodontics Restorative Dent **21**(6): 561-7.
-

-
- 78 Waibel, A. (2006). "Osteotomie; der Einfluss des Sägeblattes auf die Knochenheilung. Inaugural Dissertation, Vetsuisse Fakultät ZH, Universität Zürich, Studentenverlag."
- 79 Walsh, J. T., Jr., T. J. Flotte, et al. (1989). "Er:YAG laser ablation of tissue: effect of pulse duration and tissue type on thermal damage." Lasers Surg Med **9**(4): 314-26.
- 80 Walsh, J. T. and F. T.J. (1989). "Er:YAG laser ablation of tissue: measurement of ablation rates." Lasers Surg Med **9**: 327-337.
- 81 Walter, M. L., M. E. Domes, et al. (1999). "Photoablation of bone by excimer laser radiation." Lasers Surg Med **25**(2): 153-8.
- 82 Wigdor, H. A., J. T. Walsh, Jr., et al. (1995). "Lasers in dentistry." Lasers Surg Med **16**(2): 103-33.
- 83 Willenegger, H., S. M. Perren, et al. (1971). "[Primary and secondary healing of bone fractures]." Chirurg **42**(6): 241-52.
- 84 Wolf, K., J. Hamar, et al. (2000). Knochenneubildung - Osteokonduktion - Osteoinduktion - unter besonderer Berücksichtigung des interfragmentären Raumes. TraumaLinc 1-2000.
- 85 Wolf, S., A. Janousek, et al. (1998). "The effects of external mechanical stimulation on the healing of diaphyseal osteotomies fixed by flexible external fixation." Clin Biomech (Bristol, Avon) **13**(4-5): 359-364.

ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Figur 1	Gerät Er:YAG Laser	Seite 31
Figur 2	Gerät Piezosurgery	Seite 31
Figur 3	Er:YAG Laser intra-OP	Seite 31
Figur 4	Piezosurgery Gerät intra-OP	Seite 31
Figur 5	Röntgenbild post-OP, mediolateral	Seite 32
Figur 6	Röntgenbild post-OP, caudocranial	Seite 32
Figur 7	Röntgenbild vier Wochen post-OP, craniocaudal und mediolateral	Seite 32
Figur 8	Röntgenbild acht Wochen post-OP, mediolateral	Seite 32
Figur 9	Röntgenbild acht Wochen post-OP, craniocaudal	Seite 32
Figur 10	Röntgenbild zwölf Wochen post-OP, mediolateral und craniocaudal	Seite 32
Figur 11	Makroskopische Übersicht, post-mortem, mediolateral	Seite 32
Figur 12	Makroskopische Übersicht, post-mortem, lateromedial	Seite 32
Figur 13	Makroskopische Übersicht, post-mortem, craniocaudal	Seite 32
Figur 14	Makroskopische Übersicht, post-mortem, caudocranial	Seite 32
Figur 15	Mikroradiographie Dickschnitt	Seite 32
Figur 16	Dickschnitt, Toluidinblaufärbung	Seite 32
Figur 17	Skizze Scoring-System Radiologie	Seite 21
Figur 18	Dickschnitt, Adobe Photoshopfärbung	Seite 32
Figur 19	Fluoreszenzschnitt, Calceingrünfärbung	Seite 31
Figur 20	Fluoreszenzschnitt, Xylenolorangefärbung	Seite 31
Figur 21	Fluoreszenzschnitt, Tetracyclinfärbung	Seite 31
Figur 22	Fluoreszenzschnitt, Calceingrün-, Xylenolorange-, Tetracyclinfärbung	Seite 31
Figur 23	Dünnschnitt, von Kossafärbung, Trans-Cortex	Seite 31
Figur 24	Dünnschnitt, von Kossafärbung, Trans-Cortex	Seite 31
Figur 25	Dünnschnitt, Toluidinblaufärbung, Trans-Cortex	Seite 31
Figur 26	Dünnschnitt, von Kossafärbung, Cis-Cortex	Seite 31
Figur 27	Dünnschnitt, von Kossafärbung, Cis-Cortex	Seite 31
Figur 28	Dünnschnitt, Toluidinfärbung, Cis-Cortex	Seite 31
Figur 29	Dünnschnitt, Toluidinfärbung, Cis-Cortex	Seite 31
Figur 30	Dünnschnitt, von Kossafärbung, Frakturlinie	Seite 31
Figur 31	Box-Plot makroskopische Befunde	Seite 26
Figur 32	Box-Plot radiologische Befunde	Seite 27
Figur 33	Box-Plot histomorphometrische Befunde Er:YAG Laser	Seite 28
Figur 34	Box-Plot histomorphometrische Befunde Piezosurgery Gerät	Seite 29
Tabelle 1	Übersicht über Schafe, Osteotomievarianten und Zeitfenster	Seite 12
Tabelle 2	Daten zu beiden Osteotomie-Systemen	Seite 13
Tabelle 3	Scoring-System Makroskopie	Seite 20
Tabelle 4	Scoring-System Radiologie	Seite 21
Tabelle 5	Makroskopische Befunde	Seite 26
Tabelle 6	Radiologische Befunde	Seite 27
Tabelle 7	Histomorphometrie des Er:YAG Lasers	Seite 28
Tabelle 8	Histomorphometrie des Piezosurgery Gerätes	Seite 29

8. DANKSAGUNG

An allererster Stelle bedanke ich mich bei **Brigitte von Rechenberg**. Sie hat mir nicht nur ein sehr spannendes Thema überlassen, sondern das Projekt auch ausgezeichnet in die Wege geleitet. Für die unzähligen wertvollen und vielfältigen Inputs – auch fürs Leben - danke ich ihr von Herzen.

Robert Sader danke ich für die Korrektur der Arbeit als Korreferent.

Stefan Stübinger danke ich für die tolle Zusammenarbeit und Unterstützung in diesem Projekt.

Für die freundliche Aufnahme in die Pferdeklinik bedanke ich mich sehr bei **Herr Prof. Jörg A. Auer**.

Herr Prof. Marc Flückiger danke ich für die kompetente Hilfe im scoren der Röntgenbilder.

Käthi Kämpf danke ich für die vielen geduldig beantworteten Fragen und die Unterstützung im Labor bei der Probenverarbeitung. Ebenfalls bedanke ich mich bei **Sabina Wunderlin** und **Kati Zlinsky**, für die Herstellung der Histologieschnitte und **Adrian Fairburn** für die Zubereitung der Fluoreszenzmarker.

Bei **Nina von der Höh** bedanke ich mich für die wertvolle und unkomplizierte Unterstützung bei der Auswertung meiner Fluoreszenzschnitte an der Tiermedizinischen Hochschule Hannover, Deutschland.

Dem **Anästhesieteam** des Tierspitals danke ich für die hervorragend geleistete Arbeit, **Viktor Haus**, **Andy Baumann** und dem **Ehepaar Knüsel** für die Betreuung und Fürsorge der Versuchstiere. Ebenfalls bedanke ich mich bei **Bruno Gerzner** und **Paul Müller** für das professionelle Handling beim Schlachten.

Bei meinem grössten Kritiker, aber auch engagiertesten Unterstützer, Anreger und Berater, **Daniel Boesch**, bedanke ich mich von ganzem Herzen – wenn du nicht wärst, wäre ich auch nicht.

Zu guter letzt ein dickes Dankeschön meinen **Teamkameraden** Mascha, Niels, Tanja, Katrin, Karina, Dinah, Alex, Käthi, Sabine, Katja, Jens, Corinne, Inka, Sandra, Oli & Oli für die super Zusammenarbeit und die tolle Zeit „da oben im Strickhof“ – mit massgebender Beteiligung von Caspar, Sunny, Pepl, Frida, Prune, Lara, Oslo und Golda.